
Bachelorarbeit

Herr

Martin Wilhelm

**Studien zur Verbesserung der
Zelladhäsion an Oberflächen
und Scaffolds**

Mittweida, 2013

Fakultät
Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik

Bachelorarbeit

Studien zur Verbesserung der Adhäsion an Oberflächen und Scaffolds

Autor:
Herr Martin Wilhelm

Studiengang:
Biotechnologie/Bioinformatik

Seminargruppe:
BI10w1-B

Erstprüfer:
Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers

Zweitprüfer:
Dr. rer. nat. Michael Szardenings

Einreichung:
Mittweida, 14.09.2013

Verteidigung/Bewertung:
Mittweida, 2013

Bibliografische Beschreibung:

Wilhelm, Martin:

Studien zur Verbesserung der Zelladhäsion an Oberflächen und Scaffolds. -
2013. – Verzeichnisse 7, Inhalt 66 S.

Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Fakultät Mathematik/
Naturwissenschaften/Informatik, Bachelorarbeit, 2013

Referat:

Die Arbeit beschäftigt sich mit der Behandlung von Oberflächen und Scaffolds zur Verbesserung des Wachstums von Melanozyten aus der humanen Haut. Es soll dabei untersucht werden, ob sich eine enzymatische Behandlung ähnliche Resultate zeigt wie die konventionelle Plasmabehandlung.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich an dieser Stelle bei allen Personen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Bachelorarbeit begleitet und unterstützt haben.

Mein Dank gilt vor allem meinem Betreuer Dr. Michael Szardenings und Dr. Vuk Savkovic, die es mir ermöglichten meine Arbeit am Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie in Zusammenarbeit mit dem Translationszentrum für Regenerative Medizin Leipzig zu schreiben. Sie unterstützten und motivierten mich in meinen Tätigkeiten zu dieser Zeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeiterinnen beider Arbeitsgruppen und Kollegen vom IZI und TRM, die mir während meiner Arbeit immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ebenfalls danke ich besonders meinem Hochschulbetreuer Prof. Dr. Rösbe Wünschiers und Frau Sandra Feik, die mich schon während meines Praktikums betreute.

Ein großer Dank gilt zudem meiner Familie und meinen Eltern die mir dieses Studium ermöglichten und mich darin immer bestärkten. Hier hervorzuheben ist besonders ihr unermüdlicher Wille zu verstehen, mit was ich mich während meines Studiums befasste.

Zum Schluss bedanke ich mich auch bei meinen Freunden und Kommilitonen die mich das gesamte Studium über begleiteten und unterstützen.

Inhalt

Inhalt I

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| Abbildungsverzeichnis..... | IV |
|-----------------------------------|-----------|

| | |
|-----------------------------------|------------|
| Abkürzungsverzeichnis..... | VII |
|-----------------------------------|------------|

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | <i>Polystyrolgefäße</i> | 1 |
| 1.2 | <i>Polypropylengefäße</i> | 2 |
| 1.3 | <i>Scaffolds</i> | 2 |
| 1.3.1 | <i>Polystyrol-Scaffolds</i> | 3 |
| 1.3.2 | <i>Polyglactin-Scaffolds</i> | 3 |
| 1.4 | <i>Laccase und Substrate</i> | 4 |
| 1.5 | <i>Melanozyten</i> | 6 |
| 1.6 | <i>Mesenchymale Stammzellen</i> | 7 |
| 1.7 | <i>Immunfluoreszenz</i> | 7 |
| 1.8 | <i>WST</i> | 7 |
| 1.9 | <i>Laserscanning-Mikroskop</i> | 8 |
| 2 | Zielstellung | 9 |
| 3 | Material | 10 |
| 3.1 | <i>Chemikalien</i> | 10 |
| 3.2 | <i>Zelllinien</i> | 11 |
| 3.3 | <i>Medien</i> | 12 |
| 3.4 | <i>Molekularbiologische Reagenzien</i> | 13 |
| 3.5 | <i>Material</i> | 13 |
| 3.6 | <i>Geräte</i> | 14 |
| 4 | Methoden | 17 |
| 4.1 | <i>Zellkulturroutine</i> | 17 |
| 4.1.1 | <i>Kultivierung der Zellen</i> | 17 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.1.2 | Splitten..... | 17 |
| 4.1.2.1 | Trypsinieren | 17 |
| 4.1.2.2 | Zellzahl | 18 |
| 4.1.2.3 | Aussäen..... | 18 |
| 4.1.3 | Zellen einfrieren und auftauen | 18 |
| 4.2 | <i>Behandlung der Polystyrolmaterialien</i> | <i>18</i> |
| 4.2.1 | Behandlung der Polystyrol-Petrischalen..... | 19 |
| 4.2.2 | Behandlung der Polystyrol-96-Lochplatten..... | 19 |
| 4.2.3 | Behandlung der Polystyrol-6-Lochplatten..... | 20 |
| 4.2.4 | Behandlung der 96-Loch Polystyrolscaffolds..... | 20 |
| 4.2.5 | Behandlung der 12-Loch Polystyrolscaffolds..... | 20 |
| 4.3 | <i>Behandlung der Polypropylenschalen</i> | <i>20</i> |
| 4.4 | <i>Behandlung der Polyglactinfäden</i> | <i>20</i> |
| 4.5 | <i>Wachstumsversuche</i> | <i>21</i> |
| 4.5.1 | Untersuchung des Wachstums von NHEMs auf PS..... | 21 |
| 4.5.2 | Untersuchung des Wachstums von MSCs auf PS | 21 |
| 4.5.3 | Untersuchung des Wachstums von NHEMs auf PP..... | 21 |
| 4.5.4 | Untersuchung des Wachstums von NHEMs auf Polyglactin-Fäden | 22 |
| 4.6 | <i>WST-Analysen.....</i> | <i>22</i> |
| 4.6.1 | WST-Analyse auf Oberflächen | 22 |
| 4.6.2 | WST-Analyse auf Scaffolds | 22 |
| 4.7 | <i>Bestimmung der Melaninproduktion</i> | <i>23</i> |
| 4.7.1 | Bestimmung der Melaninproduktion auf Oberflächen..... | 23 |
| 4.7.2 | Bestimmung der Melaninproduktion auf Scaffolds | 24 |
| 4.8 | <i>Immunfluoreszenz</i> | <i>25</i> |
| 4.8.1 | Immunfluoreszenz von NHEMs auf PS-Scaffolds | 25 |
| 4.8.2 | Immunfluoreszenz von NHEMs auf Polyglactin-Fäden | 26 |
| 5 | Ergebnisse | 27 |
| 5.1 | <i>Wachstum von NHEMs auf PS.....</i> | <i>27</i> |
| 5.2 | <i>Wachstum von MSCs auf PS</i> | <i>28</i> |
| 5.3 | <i>Wachstum von NHEMs auf PP.....</i> | <i>31</i> |
| 5.4 | <i>Immunfluoreszenz</i> | <i>35</i> |
| 5.4.1 | Immunfluoreszenz von NHEMs auf PS-Scaffolds | 35 |
| 5.4.2 | Immunfluoreszenz von NHEMs auf Polyglactin-Faden | 35 |
| 5.5 | <i>WST-Analyse.....</i> | <i>36</i> |
| 5.5.1 | WST-Analyse mit NHEMs auf PS-Oberflächen | 36 |
| 5.5.2 | WST-Analyse mit HMs auf PS-Oberflächen | 37 |
| 5.5.3 | WST-Analyse mit NHEMs auf PS-Scaffolds..... | 38 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.6 | <i>Bestimmung der Melaninproduktion</i> | 44 |
| 5.6.1 | Melaninproduktion von NHEMs auf PS-Oberflächen..... | 44 |
| 5.6.2 | Melaninproduktion von HMs auf PS-Oberflächen..... | 47 |
| 5.6.3 | Melaninproduktion von NHEMs auf PS-Scaffolds..... | 50 |
| 6 | Diskussion..... | 57 |
| 6.1 | <i>Wachstum von MSCs auf PS.....</i> | 57 |
| 6.2 | <i>Wachstum von NHEMs auf PP und PS</i> | 58 |
| 6.3 | <i>WST-Analyse.....</i> | 59 |
| 6.3.1 | WST-Analyse von Zellen auf Oberflächen..... | 59 |
| 6.3.2 | WST-Analyse mit NHEMs auf Scaffolds..... | 60 |
| 6.4 | <i>Bestimmung der Melaninproduktion</i> | 61 |
| 6.4.1 | Bestimmung der Melaninproduktion auf Oberflächen..... | 61 |
| 6.4.2 | Bestimmung der Melaninproduktion auf Scaffolds..... | 62 |
| 6.5 | <i>Immunfluoreszenz</i> | 64 |
| 7 | Ausblick..... | 65 |
| 8 | Zusammenfassung | 66 |
| 9 | Literatur | 67 |
| | Selbstständigkeitserklärung..... | 73 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1 Pipettierschema für die Behandlung von PS-Platten | 19 |
| Abbildung 2 Verdünnungsreihe für die Standardkurve des synthetische hergestellten Melanins..... | 24 |
| Abbildung 3 Ausgezählte NHEMs pro 0,1 mm ² auf einer PS-Platte | 28 |
| Abbildung 4 Phasenkontrastaufnahme von MSCs auf einer PS-Platte, (A) Kaffeesäure mit Laccase, (B) Dopamin mit Laccase, (C) L-DOPA mit Laccase, (D) unbehandelt, (E) Puffer mit Laccase, Aufnahme in 10x Vergrößerung..... | 29 |
| Abbildung 5 Phasenkontrastaufnahme von MSCs auf einer PS-Platte, (A) Kaffeesäure mit Laccase, (B) Dopamin mit Laccase, (C) L-DOPA mit Laccase, (D) unbehandelt, (E) Puffer mit Laccase, Aufnahme in 10x Vergrößerung..... | 30 |
| Abbildung 6 Phasenkontrastaufnahme von NHEMs auf einer behandelten PS-Platte, (A) Kaffeesäure mit Laccase, (B) Dopamin mit Laccase, (C) L-DOPA mit Laccase, (D) unbehandelt, (E) Puffer mit Laccase, Aufnahmen in 10x Vergrößerung | 32 |
| Abbildung 7 Immunfluoreszenzaufnahme von NHEMs auf PP, Färbung: Propidiumiodid, Aufnahme in 20x Vergrößerung..... | 33 |
| Abbildung 8 Ausgezählte NHEMs pro 0,1 mm ² auf einer PP-Platte | 34 |
| Abbildung 9 Immunfluoreszenzaufnahmen am LSM von NHEMs im PS-Scaffold die mit NKI/beteb und DAPI gefärbt wurden, 68x Vergrößerung..... | 35 |
| Abbildung 10 Immunfluoreszenzaufnahmen am LSM von NHEMs auf Polyglactin-Faden die mit NKI/beteb und DAPI gefärbt wurden, Autofluoreszenz des Fadens, 68x Vergrößerung..... | 36 |
| Abbildung 11 MW und Stabw der Extinktionswerte des WST von NHEMs auf einer behandelten 96-Lochplatte | 37 |
| Abbildung 12 MW und Stabw der Extinktionswerte des WST von HMs auf einer behandelten 96-Lochplatte | 38 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 13 Extinktionswerte aus einer WST-Analyse zur Bestimmung einer Standardkurve von NHEMs auf behandelten PS-96-Lochplatten | 39 |
| Abbildung 14 MW und Stabw von Extinktionswerten der WST-Analyse A, NHEMs auf PS-Scaffolds | 40 |
| Abbildung 15 MW und Stabw von Extinktionswerten der WST-Analyse B, NHEMs auf PS-Scaffolds | 41 |
| Abbildung 16 MW und Stabw von Extinktionswerten der WST-Analyse C, NHEMs auf PS-Scaffolds | 42 |
| Abbildung 17 Berechnete Anzahl der Zellen der WST-Analyse A mit Hilfe der Standardkurve..... | 43 |
| Abbildung 18 Berechnete Anzahl der Zellen der WST-Analyse B mit Hilfe der Standardkurve..... | 43 |
| Abbildung 19 Berechnete Zellzahl der Zellen der WST-Analyse C mit Hilfe der Standardkurve..... | 44 |
| Abbildung 20 MW und Stabw der Anzahl an gezählten NHEMs in einer PS-6-Lochplatte (Lochfläche 9,6 cm ²) | 45 |
| Abbildung 21 Standardkurve aus der Verdünnungsreihe des synthetischen Melanins für den Versuch NHEMs in einer PS-6-Lochplatte | 45 |
| Abbildung 22 Berechnete Menge Melanin in 150 µl Lysat von NHEMs in PS-6-Lochplatten | 46 |
| Abbildung 23 Berechnete Menge Melanin pro Zelle von NHEMs in PS-6-Lochplatte | 47 |
| Abbildung 24 MW und Stabw der Anzahl an gezählten HMs in einer PS-6-Lochplatte (Lochfläche 9,6 cm ²) | 48 |
| Abbildung 25 Standardkurve aus der Verdünnungsreihe des synthetischen Melanins für den Versuch HMs in einer PS-6-Lochplatte | 48 |
| Abbildung 26 Berechnete Menge Melanin in 150 µl Lysat von HMs in PS-6-Lochplatten | 49 |
| Abbildung 27 Berechnete Menge Melanin pro Zelle von HMs in PS-6-Lochplatte | 50 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 28 MW und Stabw der Anzahl an gezählten NHEMs in einem 12-Loch-PS-Scaffold von Versuch MelaninA..... | 51 |
| Abbildung 29 MW und Stabw der Anzahl an gezählten NHEMs in 12-Loch-PS-Scaffold von Versuch MelaninB | 52 |
| Abbildung 30 Standardkurve aus der Verdünnungsreihe des synthetischen Melanins für den Versuch NHEMs in 12-Loch-PS-Scaffold | 52 |
| Abbildung 31 Berechnete Menge Melanin in 150 µl Lysat von NHEMs in 12-Loch-PS-Scaffold für Versuch MelaninA..... | 53 |
| Abbildung 32 Berechnete Menge Melanin in 150 µl Lysat von NHEMs in 12-Loch-PS-Scaffold für Versuch MelaninB..... | 54 |
| Abbildung 33 Berechnete Menge Melanin pro Zelle von NHEMs in 12-Loch-PS-Scaffold für Versuch MelaninA..... | 55 |
| Abbildung 34 Berechnete Menge Melanin pro Zelle von NHEMs in 12-Loch-PS-Scaffold für Versuch MelaninB..... | 56 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|--|
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| DLM | DermaLife Medium |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EZM | Extrazelluläre Matrix |
| FBS | Fetal Bovin Serum → fötales Rinderserum |
| HM | Haar-Melanozyten |
| L-DOPA | L-3,4-Dihydroxyphenylalanin |
| MW | Mittelwert |
| NHEM | normale humane epidermale Melanozyten |
| PCMM | PromoCell Melanozyten Medium |
| PBS | Phosphate Buffered Saline → phosphatgepufferte Salzlösung |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PI | Propidiumiodid |
| PP | Polypropylen |
| PS | Polystyrol |
| RT | Raumtemperatur |
| SSC | Citratpuffer |
| Stabw | Standardabweichung |
| TNS | Trypsin Neutral Solution → trypsin-neutralisierende Lösung |
| WST | 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid |
| VE | voll entsalzt |

1 Einleitung

Die in der modernen Zellkultur verwendeten Methoden stellen besonders hohe Ansprüche an die Kultivierungsbedingungen der kultivierten Zellen. Auch die genutzten Gefäße, in denen die Kulturen wachsen sollen, haben einen großen Einfluss auf Erfolg oder Misserfolg der Kultur. Seit den 60er Jahren werden in der Zellkultur Gefäße aus Plastik verwendet.

1.1 Polystyrolgefäße

Einen besonders großen Anteil nehmen die Gefäße aus Polystyrol (PS) ein. Die Vorteile des Einsatzes dieses Polymers liegen in seiner einfachen Verarbeitung mittels Spritzguss, in seiner guten Mikroskopierbarkeit und der einfachen Sterilisierung durch Bestrahlung. Es ist zudem sehr kostengünstig aus Styrol herstellbar, das allerdings in aller Regel mehr oder weniger stark mit anderen Kohlenwasserstoffen verunreinigt ist. Der große Nachteil, der neben den häufigen Verunreinigungen des Ausgangsmaterials im Grunde fast die Unzweckmäßigkeit dieses Produktes beim Einsatz mit adhärent wachsenden Zellen darstellt, liegt in seiner starken Hydrophobizität. Das führt dazu, dass die Zellen schlechte Bedingungen für die Anhaftung, Ausbreitung und Proliferation vorfinden [Ryan J. A. (2008)]. Um dieses Problem zu umgehen, werden die Oberflächen der Zellkulturgefäße vorbehandelt. Modifiziert werden sie dabei mittels Plasmabehandlung. Eine einfache und häufig verwendete Methode ist die atmosphärische Plasmabehandlung. Bei diesem Verfahren wird eine elektrische Energiequelle in Kombination mit atmosphärischem Sauerstoff verwendet. Bei einer Glimmentladung entsteht dann aktives Plasma. Eine zweite Möglichkeit bietet die Vakuumplasmabehandlung. Hier wird eine Elektrizität oder Radiofrequenzen als Energiequelle verwendet. In Verbindung mit unter Druck stehenden Gasen wie Sauerstoff oder einem Sauerstoff-Stickstoff-Gemisch kommt es dann in einer Vakuumkammer zur Entstehung von reaktivem Plasma. Bei beiden Verfahren führt die Erzeugung von aktivem Plasma über der Gefäßoberfläche ebenfalls zur Bildung von energetischen Sauerstoffspezies, die mit dem Polymer und dessen Seitengruppen reagieren und dabei den Sauerstoffgehalt im Material erhöhen sowie die aromatischen Gruppen reduzieren. Diese Veränderungen bewirken eine Verbesserung der Hydrophilizität, durch entstandene phenolische und carboxylische Gruppen und damit der Benetzbarkeit des Polystyrols. Die Oberfläche wird zudem deutlich rauer. Diese neuen Eigenschaften führen zu

einer besseren Proteinabsorption und zu einer nachweislich verstärkten Zellanheftung und einem verbesserten lateralen Wachstum [Vespermann, Ute (2005)]. Diese Art der Behandlung führt aber zu einem weiteren Nachteil. Die durch das Plasma entstandenen Radikale erzeugen auch toxische Nebenprodukte, welche sich negativ auf die spätere Zellkultur auswirken können. Durch Abstandshalter, die bei diesem Verfahren verwendet werden, kommt es zusätzlich zu der Entstehung von Bereichen der Zellkulturgefäße, auf denen keine Zellen wachsen. Diese entstehenden Nachteile führen zu einer sinkenden Reproduzierbarkeit für die Zellkultur.

1.2 Polypropylengefäße

Polypropylen ist ein Kunststoff der seine Anwendung unter anderem im Bereich der Verpackungsmaterialien und Industriekomponenten findet. Besonders Eigenschaften wie seine Härte, Hitzeresistenz leichte Verarbeitung und der geringe Preis machen ihn dafür so lukrativ [Sato H. & Ogawa H. (2009)]. Polypropylen entsteht durch die Polymerisation des Gases Propen, welches als Nebenprodukt bei der Verarbeitung von Erdöl entsteht und sehr rein darstellbar ist. Ein weiteres großes Anwendungsgebiet, findet sich im Bereich der chirurgischen Medizin. In Form von Netzen dient der Kunststoff hier zur Stabilisierung von Leistenbrüchen bei Hernienoperationen. Eigenschaften die dem Polymer hier zugutekommen sind seine Biokompatibilität und sein inerter Charakter. Polypropylen an sich ist nicht toxisch, nicht kanzerogen, abbauresistent und kann gut sterilisiert werden [Ostergrad D. R. & Patel H. (2012)]. Im Vergleich zu Polystyrol hat es einen Vorteil, wenn es um den Rohstoff geht. Während dieses aus flüssigem Styrol synthetisiert wird, ist Propen gasförmig. Das hat den Vorteil, dass der Ausgangsstoff des Polypropylen in sauberer Form verwendet werden kann, das Endprodukt also weniger Verunreinigungen enthält. Es würde sich dadurch ein Vorteil im Bereich der Zellkultur ergeben, da die Zellen nicht mit unnötigen Verunreinigungen in Verbindung kommen. Allerdings werden dem Polypropylen beim Polymerisationsprozess Stabilisatoren zugeführt um seine physikalischen Eigenschaften zu erhalten. Diese können ebenfalls mit den Zellen in der Kultur reagieren. Außerdem sind die optischen Eigenschaften von Polypropylen ungünstig.

1.3 Scaffolds

In Einsatzfeldern wie der Grundlagenforschung oder der Medikamentenentwicklung spielen Zell-basierende in vitro Assays eine wichtige Rolle. So gut und einfach in der Handhabung zweidimensionale Zellkulturgefäße scheinen, so schnell stoßen sie auch an ihre Grenzen. Dem Zellwachstum in normalen Zellkulturflaschen fehlen viele biophysikalischen

und biochemischen Reize, welche die Identität und Funktionen der Zellen *in vivo* bestimmen [URL1]. Es fehlt zum einen an Zell-Zell-Signalübertragung aber auch der Kommunikation zwischen den Zellen und der Extrazellulären Matrix. Diese sind vor allem für die Zelldifferenzierung und -proliferation sowie für einige andere zelluläre Funktion unerlässlich [Bissell, M.J. et al. (2003), Abbott, A. (2003)]. Einen besseren Kultivierungsansatz bieten hier dreidimensionale Strukturen. Diese erlaubt die Nachstellung von Bedingungen, die auf einer planaren Polystyrolplatte nicht erzeugt werden können. Ein Vorteil dabei ist die gut definierte Geometrie der Zellen, welche von der Struktur direkt auf Funktionen schließen lassen kann. Das ermöglicht die Durchführung von theoretischen Analysen. Die stärkere Analogie zur Zelle im Organismus bietet die Möglichkeit die Zellform und das Zellumfeld zu betrachten. Diese können Rückschlüsse auf Genexpression und das biologische Verhalten der Zelle geben. Die Scaffolds können neben synthetischen auch aus natürlichen Polymeren bestehen. Verwendet werden unter anderem Alginat [Ayala P, Lopez J, Desai T (2010)], PLGA [Li C, Tian T, Nan K, Zhao N, Guo Y, Cui J, *et al* (2008)] oder Hydrogele [Bonaventure J, Kadhon N, Cohen-Solal L, Ng K, Bourguignon J, Lassel C, *et al.* (1994)]. Trotz dieser Vorteile ersetzt diese Art der Kultivierung nicht die Untersuchungen *in vivo*, beispielsweise an Knockout-Tieren [Müller-Klieser W. (1997)].

1.3.1 Polystyrol-Scaffolds

Für die Versuche wurden unter anderem Alvetex® Polystyrol-Scaffolds der Firma Reinnerivate verwendet. Dabei handelt es sich um 200 µm dicke Membranen aus verzweigten Polystyrolfäden. Diese Strukturierung bietet der dünnen Schicht eine trotzdem relativ gute Stabilität. Der Aufbau der Membran ermöglicht die Migration der Zellen in das Scaffold. Außerdem gewährleistet er einen Austausch von Gasen, Nährstoffen und Abfallprodukten in einer statischen Kultur. Der Vorteil dieser Art von Scaffolds liegt unter anderem auch in seiner einfachen und preisgünstigen Produktion. Das Material ist inert, kompatibel mit Standardplasmabehandlungen und Gammasterilisation. Zudem kann es wenn nötig mit Collagen, Fibronectin oder ähnlichen Substanzen beschichtet werden [Haycock J. W. et al. (2010)].

1.3.2 Polyglactin-Scaffolds

Das Polymer Polyglactin bietet eine interessante Möglichkeit um Zellen auf einem Scaffold zu kultivieren. Dieser Stoff wird aus den Substanzen Lactid und Glykolsäure synthetisiert und zeichnet sich durch seine Biokompatibilität und biologische Abbaubarkeit aus. PLGA spielt darum eine wichtige Rolle im Bereich der regenerativen Medizin und des

Tissue Engineerings, hier dient es den Zellen als abfängliche Matrix, in der sie sich auch im dreidimensionalen Raum ausbreiten. In der Medizin kommt es unter anderem als chirurgischer Nähfaden zum Einsatz. Im Organismus wird das Polymer dann durch hydrolytische Prozesse zersetzt und vom Körper resorbiert. Während dieses Vorgangs werden die instabilen Esterbindungen des Polyglactin unter Wasserabspaltung aufgetrennt und das Makromolekül in seine Ausgangsbausteine zerlegt [Gopferich, A. (1996)]. Die nichttoxischen Fragmente werden vor allem in der Leber und den Nieren angereichert und von dort ausgeschieden [Hua, N. & Sun, J. (2008)]. Wie schnell das Material dabei vom Körper abgebaut und angenommen werden kann ist vom jeweiligen Verhältnis der verwendeten Ausgangsstoffe abhängig. Außerdem spielen der pH-Wert und die Temperatur eine wichtige Rolle [Inakagi N., Narushima K. & Lim S K. (2003)]. Es wurden zudem Unterschiede der Abbauraten in vivo und in vitro beobachtet. Ein Nachteil dieses Materials ist jedoch seine relativ hohe Hydrophobizität. Dadurch fehlen ihm natürliche Bindungsstellen, was den Zellen das Adhären auf dem Untergrund erschwert [Jiao Y.-P. & Cui F.-Z (2007)]. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll die Oberfläche vor dem Kontakt mit Zellen zu verbessern. Für den Zweck der Vorbehandlung werden unter anderem die Morphologie, oberflächenchemischen Eigenschaften, Ladungseigenschaften verändert. Auch das Anbringen von Oberflächen-Makromolekülen auf dem Material unterstützt die Bindungseigenschaften. Sobald die Zellen auf die dreidimensionale Struktur aufgebracht werden, beginnen bereits die ersten Abbaureaktionen am Material. Es entsteht eine EZM um die Zellen, welche die stützende Funktion des Biopolymers übernimmt. Nach einer bestimmten Inkubationszeit in vitro, kann das Implantat in den Patienten eingebracht werden. In vivo schreiten die Zersetzungsprozesse bis zur völligen Auflösung fort. Die Zellen können so direkt in das beschädigte Gewebe einwachsen.

1.4 Laccase und Substrate

Bei den Laccasen (EC 1.10.3.2) handelt es sich um eine Enzymklasse zur Oxidation von ein- oder mehrwertigen phenolischen Verbindungen, welches vorzugsweise Monophenole zu den entsprechenden Chinonen oxidiert, ist aber in der Lage nicht-phenolische Substrate zu oxidieren. Das pH-Wert-Optimum liegt bei 5 und das Optimum der Temperatur bei 70 °C [Wood, D.A., (1979)].

Dieses Enzym ist vor allem in Pilzen und höheren Pflanzen zu finden, wurde aber auch in Insekten und Bakterien entdeckt. Strukturell gesehen liegt das aktive Holoenzym als dimeres oder tetrameres Glykoprotein vor. In jedem Monomer (50 – 100 kDa) sind vier Kupferatome nachweisbar, die sich an drei Bindungsstellen befinden und dem Enzym seine

Funktionalität verleihen. Die katalytische Reaktion der Laccase läuft wie folgt ab. Das Kupfer vom Typ 1 wird durch das Substrat reduziert, wobei dieses im Gegenzug oxidiert wird. Das übertragene Elektron wird dann zum trinuklearen Cluster, das von den Kupferatomen des Typs 2 und 3 gebildet wird, weitergeleitet. Hier wird molekularer Sauerstoff zu Wasser reduziert. Für die Oxidation eines Substrates, bei dem ein Elektron benötigt wird, findet im Gegenzug die Reduktion von Sauerstoff statt, bei dem vier Elektronen benötigt werden. Um die nötige Anzahl an Elektronen zu gewährleisten, die für die Reduktionsreaktion benötigt werden, muss die Laccase diese aus unterschiedlichen Oxidationsreaktionen speichern. Der Sauerstoff dient bei dieser Reaktion als Elektronen-Akzeptor, um die Protonen von den phenolischen Hydroxygruppen zu entfernen. Dabei entstehen Radikale, die zu einer Spaltung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen bzw. Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindungen der Alkylseitenketten, sowie zur Spaltung aromatischer Ringe führen. Anwendung findet diese katalytische Reaktion unter anderem beim Ausfällen von phenolischen Substanzen, bei der Entgiftung von industriellen Abwässern sowie bei der Sanierung von kontaminierten Böden. Laccase wird aber auch in der Lebensmittelindustrie zur enzymatischen Bräunung von Kakao oder Kaffee verwendet und in der Pharmazie bei der Herstellung von Krebsmedikamenten [Kunamneni, A., J. Plou, F., Ballesteros, A. & Alcalá, M. (2008)]. Die Verwendung erfolgt dabei üblicherweise in Lösungen und nicht an Oberflächen.

Die bei den Versuchen genutzten Verbindungen gehören zu den Diphenolen. Diese Gruppe von Verbindungen ist in der Lage schnell zu Substanzen zu reagieren, die dazu in der Lage sind zu polymerisieren. Die Verwendung von Laccase erlaubt das Arbeiten mit sehr geringen Substratkonzentrationen. Durch die Zugabe der Laccase werden diese Verbindungen zum einen einer strukturellen Veränderung unterzogen, zum anderen lagern sie sich dadurch an die Oberflächen der Polymere.

Bei dem verwendeten Substrat L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) handelt es sich um eine Aminosäure, die durch die Hydroxylierung von Tyrosin entsteht. Es ist ein Zwischenprodukt bei der Melaninbildung und bei der Biosynthese von (Nor-) Adrenalin. L-DOPA passiert im Körper leicht die Blut-Liquor-Schranke und steigert unter anderem Blutdruck und Blutzuckerspiegel [URL2]. Die vorhandenen Aminogruppen erlauben es einzelnen L-DOPA-Molekülen mit einander zu polymerisieren. Die zusätzliche Carboxygruppe erlaubt es dem Stoff Magnesium- und Kalziumionen zu binden, welche eine essentielle Rolle bei der Bildung einer EZM spielen.

Die Substanz Dopamin gehört zur Gruppe der Catecholamine und ist im Gehirn, den Nebennieren und an sympathischen Nervenenden zu finden. Im Körper fungiert es als Neurotransmitter, der bei Parkinson im extrapyramidal-motorischen System nur vermindert

auftritt. Es kommt beispielsweise bei akuter Herzinsuffizienz sowie bei Schockzuständen mit drohendem bzw. bestehendem Nierenversagen zum Einsatz [URL3]. Dopamin besitzt ebenfalls eine Aminogruppe.

Die Kaffeesäure (CA) ist in Pflanzen als freie Form, zum Großteil aber als Form von Estern und Glykosiden vertreten. Es wirkt wegen seiner leichten Oxidierbarkeit zum ortho-Chinon allergen. Die Substanz wird als Nachweismittel von Eisen(III) verwendet [URL5]. Wie das L-DOPA besitzt die Kaffeesäure eine zusätzliche Carboxygruppe.

1.5 Melanozyten

Bei denen in der Bachelorarbeit verwendeten Zelltypen handelte es sich zum einen um normale humane epidermale Melanozyten (NHEM) und follikuläre Melanozyten (HM) aus der äußeren Haarwurzelscheide. Melanozyten kommen in der Epidermis bzw. in den Haarfollikeln vor. Dieser Zelltyp ist unter anderem für die Regulation der Haut- und Haarfarbe hauptverantwortlich. Sie sind aber auch in Augen, Ohren und im zentralen Nervensystem vorzufinden, was darauf hindeutet, dass dieser Zelltyp noch weitere Funktionen in unserem Körper erfüllt [Tolk, Kai Michael (2009)]. Die Hauptaufgabe der Melanozyten ist die Produktion des pigmentierten Biopolymers Melanin, das sie synthetisieren und in Vesikeln, den Melanosomen, für die Sekretion vorbereiten. Grundlage für die Melaninsynthese bildet Tyrosin. Das Schlüsselenzym Tyrosinase übernimmt bei diesem Prozess den initialen und produktionslimitierenden Schritt. Mit seiner Hilfe wird Tyrosin durch Hydroxylierung zu L-DOPA umgesetzt und dann von diesem zusätzlich zu Dopachinon oxidiert. Aus diesem Zwischenprodukt werden durch weitere Oxidations- und Polymerisationsschritte das rötlich-gelbliche Phäomelanin und zwei Arten des braun-schwarzen Eumelanins gebildet [Brenner, M. & Berking, C. (2010)]. Das Melanin schützt den Körper vor DNA-schädigender UV-Strahlung, welche unter anderem Zellveränderungen verursacht, die Alterung der Haut beschleunigt und die Karzinogenese fördert [Schiaffino, Maria Vittoria (2010)]. NHEMs haben eine nativ kugelige Gestalt mit drei und mehr Ausläufen. Diese Dendriten sind mit Keratinozyten verbunden und bilden die sogenannten epidermalen Einheiten. Auf eine Melanozyte kommen in der Haut ca. 40 Keratinozyten. Durch die Fortläufe werden die Melanosomen an die umliegenden Zellen abgegeben, um ihre Zellkerne vor der schädlichen Sonneneinstrahlung zu schützen, denn die Vesikel verteilen sich verstärkt um den Nukleus [Tobin, D.J. (2008); Yamaguchi, Y & V.J. Hearing (2009)]. Die durch die Strahlung stimulierte Bräunung der Haut ergibt sich durch den Melaningehalt sowie Größe, Verteilung und Form der Melanosomen in den Keratinozyten [V.J. Hearing (1999)]. Die NHEMs sind ähnlich wie die HMs aufgebaut und besitzen dieselbe Funktion.

Die HMs befinden sich in der letzten Phase der Differenzierung, kurz vor den völlig funktional, melanotischen Melanozyten. Unterschiede bestehen jedoch darin, dass sie größer sind, mehr Dendriten besitzen und einen größeren Golgi-Apparat aufweisen, wodurch sie auch größere Melanosomen erzeugen. Die Haar-Melanozyten sitzen in der Haarzybel und übertragen ihre Vesikel ausschließlich an die in der Nähe wachsende Haarrinde [Cui, J., L.Y., Shen & G.C., Wang (1991); Tobin, D.J. & J.C., Bystry (1996)]. Bei epidermalen Verletzungen migrieren diese Melanozyten lateral aus dem Outer Root Sheath (ORS) an die sich regenerierenden Orte der Epidermis.

1.6 Mesenchymale Stammzellen

Bei mesenchymalen Stammzellen (MSC) handelt es sich um adulte, undifferenzierte Stammzellen. Sie haben die Fähigkeit zur Selbstreplikation, also der Zellteilung ohne Differenzierung. Außerdem sind MSCs multipotent und besitzen die Fähigkeit sich in andere spezialisierte Zellen auszudifferenzieren. Sie können so Zellen in zerstörten Geweben ersetzen. MSCs finden darum auch großes Interesse auf dem Gebiet des Tissue Engineerings [URL4, Gangji et al. 2004, Wulf et al. 2006].

1.7 Immunfluoreszenz

Der Antikörper NK1/beteb bindet an das Glykoprotein 100 welches als Antigen in normalen Melanozyten aber auch in Melanomen zu finden ist. Dieses Antigen liegt an der Innenseite von zytoplasmatischen Vesikeln der Zellen, die den Farbstoff Melanin produzieren. Der Antikörper dient zur allgemeinen Identifizierung von Melanozyten [Datasheet1]. Bei dem Stoff Propidiumiodid (PI) handelt es sich um einen DNA-Interkalator. Er färbt dabei nur tote oder sterbende Zellen, da er von lebenden Zellen ausgeschlossen wird. Die Anregung von PI erfolgt im Bereich des sichtbaren Lichts [Warning, M (1975), Running, M.P. et al. (1995)].

1.8 WST

Bei der Substanz 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (WST) handelt es sich um ein Tetrazoliumsalz mit, das in Lösung blass rötlich ist. Dieser Stoff wird in der Zellkultur unter anderem zur spektroskopischen, nicht-radioaktiven Quantifizierung der Zellproliferation, Zellviabilität und Zytotoxizität verwendet. In lebenden Zellen wird das Salz in den Mitochondrien durch die Elektronentransportkette zu Formazan reduziert, welches intensiv

gelb ist. Es ist wasserlöslich und kann mittels Extinktion gemessen werden. Je mehr WST umgesetzt wurde desto intensiver leuchtet das Formazan und desto mehr mitochondrielle Aktivität lässt sich in den Zellen verzeichnen [Datasheet2]. Die gemessene mitochondrielle Aktivität lässt sich als Maßstab der zellulären Aktivität beziehungsweise Anzahl der Zellen benutzen.

1.9 Laserscanning-Mikroskop

Wie bereits erwähnt, kommt es durch die Verwendung von dreidimensionalen Scaffolds zu Unterschieden zur normalen Zellkultur. Das räumliche Wachstum der Zellen stellt unter anderem bildgebende Verfahren vor eine Herausforderung. Die dadurch zustande kommende Morphologie der Zellen ist mit einem herkömmlichen Mikroskop auch mit einfacher Immunfluoreszenz nicht komplett visualisierbar. Ein konvokales Laserscanning-Mikroskop bietet weitere Möglichkeiten um die Zellen in ihrer Gesamtheit auf dem Scaffold darzustellen. Bei der konventionellen Mikroskopie trifft das komplette Licht oder einzelne Wellenlängen gleichzeitig auf das gesamte Objekt, dieses wird vollständig beleuchtet. Im Vergleich dazu erfolgt beim Laserscanning-Mikroskop (LSM) eine punktweise Messung. Ein fokussierter Laserstrahl trifft nur auf einzelne Punkte der Probe. Mit diesem gebündelten Licht wird das Objekt abgetastet. Das zurückgeworfene Licht fällt dann auf die konfokale Blende des Mikroskops. An dieser Stelle wird nur das gewünschte Licht durchgelassen und trifft danach auf Sekundärelektronenvervielfältiger. Hier wird das Licht detektiert und das Signal verstärkt. Die gewonnenen Informationen werden digitalisiert und an den Computer übermittelt. Bei diesem Vorgang entstehen einzelne Schnitte der Probe mit besonderer Schärfe und sehr kontrastreich. Ein motorisiertes Modul am Mikroskop ermöglicht zudem die Erzeugung mehrerer Schnitte an unterschiedlichen Z-Koordinaten. Die daraus gewonnen 3D-Datensätze ermöglichen eine 3D-Rekonstruktion der Probe. Die Zellen können so in ihrer kompletten Gestalt detailliert visualisiert werden [Wilhelm S., Gröbler B, Gluch M., Heinz H. (unbekannt)].

2 Zielstellung

Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Auswirkungen einer Behandlung von Oberflächen und Scaffolds mit dem Enzym Laccase auf humane Melanozyten. Dabei sollten das Wachstum, die Proliferation und die Melaninproduktion der Zellen untersucht werden und ob sich Vorteile gegenüber der konventionellen Plasmabehandlung zeigen.

3 Material

3.1 Chemikalien

| | |
|---|--------------------------------------|
| 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanin (Lot: 091M1366U) | Sigma-Aldrich, Deutschland |
| BSA \geq 95 % (Bovin Serum Albumin) (Batch # 087K0747) | Sigma-Aldrich, Deutschland |
| Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat (Ch. 472189462) | CARL ROTH GmbH + Co.KG, Deutschland |
| Dopaminhydrochlorid (Lot: BCBG8676U) | Sigma-Aldrich, Deutschland |
| Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca & Mg steril | PAA Laboratories, Inc., Österreich |
| FBS Standard Quality (Lot: A10110-2510) | PAA Laboratories, Inc., Österreich |
| Fluoromount (091M1261) | Sigma-Aldrich, Deutschland |
| HepesBSS (Lot: 3010217) | PromoCell GmbH |
| Isopropanol (Charge 289107727) | CARL ROTH GmbH + Co. KG, Deutschland |
| Kaffeesäure (Charge: 491180483) | CARL ROTH GmbH + Co.KG, Deutschland |
| Methanol, technisch (Lot: H00212-3647) | AppliChem GmbH Österreich |
| mono-Natriumcitrat (Charge: 309102558) | CARL ROTH GmbH + Co.KG, Deutschland |
| Natriumchlorid (Lot 0E002839) | AppliChem GmbH |

| | |
|--|--------------------------------------|
| Natriumhydroxid (Charge: 14895365) | CARL ROTH GmbH + Co.KG, Deutschland |
| Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (422186552) | CARL ROTH GmbH + Co. KG, Deutschland |
| Paraformaldehyd, reinst, DAC (31998748) | CARL ROTH GmbH + Co. KG, Deutschland |
| Saponin (Lot BCBJ4660V) | Sigma-Aldrich, Deutschland |
| TNS (0,05% Trypsin Inhibitor, 0,1% BSA) (Lot: 3010221) | PromoCell GmbH |
| Triton X-100 (Batch # 058K0073) | Sigma-Aldrich, Deutschland |
| Trypanblau-Lösung (0,4 %), steril (Lot 019K2381) | Sigma-Aldrich, Deutschland |
| Trypsin (0,05%)/EDTA (0,03%) (Lot 2121203) | PromoCell GmbH |
| Wasser doppelt destiliert (Charge: 123198534) | CARL ROTH GmbH + Co. KG, Deutschland |

3.2 Zelllinien

| | |
|------|---|
| NHEM | PromoCell GmbH |
| HM | Kultur gezüchtet aus dem Haarfollikel |
| MSC | Arbeitsgruppe Stammzelltherapie, Abteilung Zelltherapie, Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie |

3.3 Medien

| | |
|---|--|
| CryoSFM (Lot: 0082512) | PromoCell GmbH |
| FrostaLife (Lot 03064) | LifeLine® Cell Technology |
| DMEM low Glucose (1g/l) ohne L-Glutamin (Lot: E00512-2138) | PAA Laboratories, Inc., Österreich |
| PromoCell Melanozyten Medium (PCMM) | PromoCell GmbH |
| <ul style="list-style-type: none"> • Melanocyte Growth Medium M2 (Lot: 3032506) • SupplementMix (Lot: 3030403) • Gentamycin 10 mg/ml (Lot: P00412-1401) | PAA Laboratories, Inc., Österreich |
| DermaLife® Medium (DLM) | LifeLine® Cell Technology |
| <ul style="list-style-type: none"> • DermaLife® Basal Medium (Lot: 02736) • DermaLife® M LifeFactors® Kit (Lot: 02934) <ul style="list-style-type: none"> ○ L-Glutamin (Lot: 02889) ○ Ascorbinsäure (Lot: 02878) ○ rh Insulin Lot: (02932) ○ Epinephrin (Lot: 02554) ○ CaCl₂ (Lot: 02338) ○ StiMel8™ (Lot: 02556) • Gentamycin 10 mg/ml (Lot: P00412-1401) | PAA Laboratories, Inc., Österreich |
| MSC-Medium | |
| <ul style="list-style-type: none"> • DMEM low Glucose (1g/l) ohne L-Glutamin (Lot: E00512-2138) • FBS Standard Quality (Lot: A10110-2510) | PAA Laboratories, Inc., Österreich PAA Laboratories, Inc., Österreich |

3.4 Molekularbiologische Reagenzien

| | |
|---|------------------------------|
| Anti-Melanoma Associated Antigen 100+/7 antibody [NK1/beteb] (Lot GR646141) | Abcam plc, UK |
| DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) | Invitrogen GmbH, Deutschland |
| Goat-anti-mouse-IgG-Biotin (Ch. W02006) | Biozol Diagnostica GmbH |
| Propidiumiodid-Lösung (019K1149) | Sigma-Aldrich, Deutschland |
| Streptavidin, Alexa Fluor® 594 conjugate (Lot 727767) | Invitrogen GmbH, Deutschland |
| Streptavidin, Alexa Fluor® 647 conjugate (Lot 1371335) | Invitrogen GmbH, Deutschland |
| Zell-Proliferations-Reagenz WST 1 (Lot: 14029700) | Roche Diagnostics GmbH |

3.5 Material

| | |
|--|---|
| 6 Well Cell Culture Plate steril, with lid (Lot E110704J) | CellStar® Greiner Bio-One GmbH, Deutschland |
| 6 Well Multidish 6 SI steril, non-treated | Thermo Fisher Scientific Inc |
| 12 Well Plate with lid containing Alvetex® Polystyrene Scaffolds (Lot 5REN001) | AMS Biotechnology (Europe) Ltd |
| 24 Well Cell Cultrue Plate steril, with lid (Lot E09060UV) | CellStar® Greiner Bio-One GmbH, Deutschland |
| 96 Well Cell Culture Plate steril, with lid, F-bottom (Lot E1230AW) | CellStar® Greiner Bio-One GmbH, Deutschland |

| | |
|---|---|
| 96 Well Cell Culture Plate steril, with lid, U-bottom (Lot E1230AW) | CellStar® Greiner Bio-One GmbH, Deutschland |
| 96 Well Plate with lid containing Alvetex® Scaffolds membrane (Lot 2REN019/1) | AMS Biotechnology (Europe) Ltd |
| Cellstar Zellkulturflaschen T25 (Lot E120608B) | Greiner Bio-One GmbH, Deutschland |
| Cellstar Zellkulturflaschen T75 (Lot E1110050) | Greiner Bio-One GmbH, Deutschland |
| Chamber Slides™, 8Well Permanox® Slide (Lot 618807) | Lab-Tek® Nunc |
| Cryo.s™, 2 ml Tubes (Lot E1005088) | Greiner Bio-One GmbH, Deutschland |
| Mikroplatte (PS) 96, F-bottom (Lot 351211) | Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel |
| Polyglactin 910 (Lot EJ8JXGQ0) | ©Johnson & Johnson Medical GmbH |
| Petir dish (PS) (Lot G130205P) | Greiner Bio-One GmbH, Deutschland |
| Polypropylenschalen | Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel |

3.6 Geräte

| | |
|---------------------------------|---|
| Axio Observer Z1 | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland |
| Biowizard Silver Line, Class II | Kojar Tech Oy, Finnland |
| Centrifuge 5424 | Eppendorf AG, Deutschland |
| CO ₂ -Inkubator CB | BINDER GmbH |

| | |
|--|---|
| HeraCell 240 | Thermo Fisher Scientific Inc |
| Labor-Mikroskop Leica DMIL | Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie |
| LSM 710 | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland |
| Multiskan Spektrum | Thermo Fisher Scientific Inc. |
| “Mr. Frosty” Freezing Container | Thermo Fisher Scientific Inc. |
| Neubauer-Zählkammer improved (Tiefe 0,1 mm) | Paul Marienfeld GmbH & Co. KG |
| Nikon ECLIPSE TS100 | Nikon GmbH, Deutschland |
| Nikon ECLIPSE Ti-S | Nikon GmbH, Deutschland |
| Polymax 1040 und 1020 | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG |
| Rotina 420 | Hettich Zentrifugen |
| Thermomixer compact | Eppendorf AG, Deutschland |

4 Methoden

4.1 Zellkulturroutine

4.1.1 Kultivierung der Zellen

Die verwendete NHEMs und MSCs wuchsen bei 37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxidanteil und einer Luftfeuchtigkeit von 100 % im Inkubator. Bei den HMs wurde die Sauerstoffkonzentration im Inkubator zusätzlich auf 5 % gesenkt. Für einen Mediumwechsel wurden die Medien im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Für die NHEMs wurde das PromoCell Melanozyten Medium (PCMM) mit Gentamycin verwendet. Die MSCs wuchsen in DMEM mit 5 % Serum. Für die HMs wurde das DermaLife® Medium (DLM) mit Gentamycin verwendet. Das alte Medium wurde aus den Zellkulturgefäßen (T25/T75) abgesaugt und frisches Medium (5 ml/13 ml) zugegeben. Im Anschluss wurden die Zellen in den Inkubator zurückgestellt und bei den oben genannten Bedingungen kultiviert.

4.1.2 Splitten

Die zu passagierenden Zellkulturflaschen wurden vor dem Splitten unter dem Inversmikroskop auf Zellzustand, Kontaminationen und Konfluenzgrad untersucht. Ein Splitten der Zellen erfolgte bei einem Grad der Konfluenz größer 70 %. Zur Vorbereitung wurden alle verwendeten Lösungen und das Medium im Wasserbad bei 37 °C vorgewärmt.

4.1.2.1 Trypsinieren

Das Medium wurde aus der Zellkulturflasche entnommen und die Zellen mit 1 ml (T25-Flaschen) bzw. 2 ml (T75-Flaschen) HepesBSS gewaschen. Die Waschlösung wurde abgesaugt und die Zellen mit 0,5 ml bzw. 1,5 ml Trypsin/EDTA versetzt. Sie wurden für 4 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde der Grad der Ablösung der Zellen unter dem Inversmikroskop geprüft. Durch leichtes Abklopfen der Zellkulturgefäße konnte dies unterstützt werden. Waren trotzdem noch viele Zellen adhärent, wurden diese für längere Zeit weiter mit Trypsin/EDTA inkubiert. Nach ausreichender Ablösung der Kultur wurde zum Abstoppen der Reaktion dem Trypsin/EDTA 0,5 ml (T25) bzw. 1,5 ml (T75) TNS zugesetzt. Mit diesem Gemisch wurden die Zellkulturgefäßen mehrfach gespült und die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurde zusätzlich ein zweites Mal mit PBS nachgespült und die Flüssigkeit zur Suspension zuge-

führt. Die Zellen wurden im Anschluss bei 220 rcf für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in frischen Medium resuspendiert.

4.1.2.2 Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 40 µl der Zellsuspension in eine 96-Lochplatte überführt und nach Zugabe von 40 µl Trypanblau gut durchmischt. Die Suspension wurde in eine vorbereitete Zählkammer nach Neubauer pipettiert und auf beiden Seiten alle vier Eckquadrate unter dem Mikroskop ausgezählt. Aus den beiden Werten wurde der Mittelwert (MW) gebildet und daraus die Zellzahl mit der folgenden Formel bestimmt.

$$\text{Zellzahl} = \frac{MW}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} * \text{Kammertiefe (mm)} * \text{Verdünnung}} \left[\frac{\text{Zellen}}{\mu\text{l}} \right]$$

4.1.2.3 Aussäen

Die benötigte Anzahl der auszusäenden Zellen wurde berechnet und das entsprechende Volumen in die Zellkulturflasche mit 5 ml bzw. 13 ml Medium gegeben. Die Zellen wurden in den Gefäßen homogen verteilt und in den Inkubator zurückgestellt.

4.1.3 Zellen einfrieren und auftauen

Für das Einfrieren der Zellen wurde die Suspension nach dem Zählen erneut bei 220 rcf für 4 min zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt, das Pellet in 4°C kaltes Kryomedium resuspendiert und die Suspension in ein vorbereitetes Kryogefäß überführt. Für die NHEMs und MSCs wurde das CryoFSM verwendet. Die HMs wurden in FrostaLife eingefroren. Die Zellen kühlten langsam bei – 80 °C im vorgekühlten Isopropanolbad „Mr.Frosty“ herunter und wurden nach zwei Tagen in -150 °C umgesetzt.

Für das Auftauen der Zellen wurde das Medium in den Zellkulturflaschen im Brutschrank für 30 min vorinkubiert. Die Kryogefäße wurden aus der -150 °C Lagerung entnommen und schnell im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Im Anschluss wurde die Suspension in die vorbereiteten Gefäße überführt, das Gemisch homogen verteilt und bei 37 °C im Inkubator kultiviert. Nach einem Tag erfolgte ein kompletter Medienwechsel der aufgetauten Zellen.

4.2 Behandlung der Polystyrolmaterialien

Die Vorbereitungen und die Behandlung der Materialien erfolgten unter der Sterilwerkbank. Für die Behandlungen wurde ein Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7) und Substratlösun-

gen von Kaffeesäure, L-DOPA und Dopamin jeweils 0,15 μM verwendet. Die Substrate wurden im Phosphatpuffer gelöst. Die Laccaselösung hatte eine Konzentration von 2 mg/ml. Substrat- und Laccaselösungen sind für jeden Versuch frisch herzustellen. Zudem kam ein 2x Citratpuffer (SSC) zum Einsatz (0,3 M Natriumchlorid, 0,003 M Natriumcitrat, pH 7).

4.2.1 Behandlung der Polystyrol-Petrischalen

Um die Oberfläche der Petrischalen zu behandeln, wurden auf jeden markierten Kreis (Abbildung 1, S.19)

80 μl der entsprechenden Lösungen pipettiert und dann 3 μl der Enzymlösung in den Tropfen gegeben, zusätzlich wurden Kontrollen ohne Laccase angelegt. Die Platten wurden für eine Stunde bei RT inkubiert.

Die Tropfen wurden abgenommen und die entsprechenden Stellen zweimal mit sterilem voll entsalzten(VE)-Wasser gewaschen.

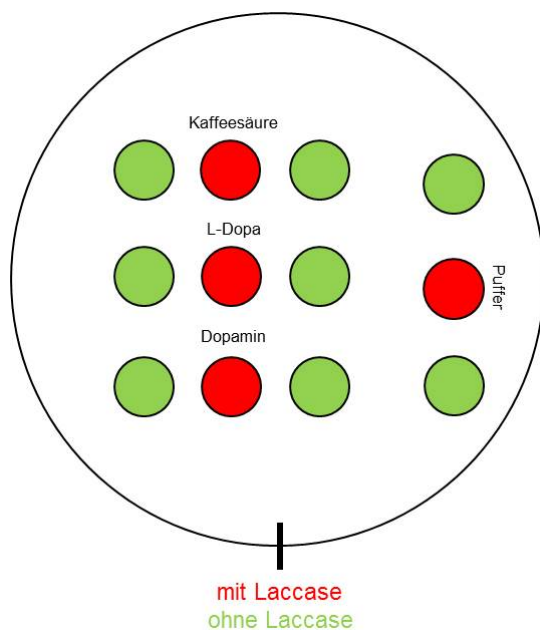


Abbildung 1 Pipettierschema für die Behandlung von PS-Platten

4.2.2 Behandlung der Polystyrol-96-Lochplatten

Zur Behandlung der Oberflächen wurden 100 μl die entsprechende Lösung pipettiert und 3,75 μl Laccaselösung zugefügt. Die Platten wurden bei 100 rpm auf dem Schüttler für eine Stunde inkubiert. Das Gemisch wurde abgesaugt und die Löcher 2-mal mit sterilem VE-Wasser gewaschen.

4.2.3 Behandlung der Polystyrol-6-Lochplatten

Zur Modifizierung der Gefäße wurden 6 ml jedes Substrates und des Puffers in ein Reaktionsgefäß gegeben und dann mit 75 µl Laccaselösung versetzt. Das Gemisch wurde für eine Minute stehen gelassen und dann je 2 ml in die vorgesehen Löcher verteilt. Die Platten wurden auf einem Schüttler für eine Stunde bei 100 rpm inkubiert. Die Lösungen wurden entfernt und zweimal mit je 2 ml VE-Wasser (steril) gewaschen.

4.2.4 Behandlung der 96-Loch Polystyrolscaffolds

Zur Behandlung der 96-Well Scaffolds wurden in jedes Loch 200 µl der entsprechenden Lösung pipettiert. Zusätzlich wurden 7,5 µl Laccaselösung zum Puffer-Substrat-Gemisch gegeben. Danach wurden sie für 2,5 h auf dem Schüttler bei 120 rpm inkubiert. Das Gemisch wurde abgesaugt und die Scaffolds 2-mal mit VE-Wasser gewaschen.

4.2.5 Behandlung der 12-Loch Polystyrolscaffolds

Zur Behandlung der 12-Well Scaffolds wurden in jedes Loch 1 ml der entsprechenden Lösung pipettiert. Zusätzlich wurden 37,5 µl Laccaselösung in das Loch gegeben. Danach wurden sie für 2,5 h auf dem Schüttler bei 120 rpm inkubiert. Das Gemisch wurde abgesaugt und die Scaffolds 2-mal mit VE-Wasser gewaschen.

4.3 Behandlung der Polypropylenschalen

Vor der Behandlung der Polypropylenplatten wurden diese leicht geneigt. In der schräg gehaltenen Schale wurden 2 ml der entsprechenden Puffer-Substratgemische gegeben. Im Anschluss wurden 75 µl Laccase zugefügt und die Platte für ein bis zwei Stunden inkubiert. Das Gemisch wurde entfernt und die behandelte Stelle 2-mal mit VE-Wasser (steril) gespült.

4.4 Behandlung der Polyglactinfäden

Für die Behandlung der Polyglactinfäden wurden diese in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 2 ml des jeweiligen Puffer-Substrat-Gemisches versetzt. Zu diesen 2 ml wurden 75 µl Laccase gegeben und die Reaktionsgefäße gevortext. Anschließend wurden sie für 2 h auf dem Schüttler bei 120 rpm inkubiert. Das Gemisch wurde abgesaugt und die Fäden 2-mal mit VE-Wasser (steril) gewaschen.

4.5 Wachstumsversuche

4.5.1 Untersuchung des Wachstums von NHEMs auf PS

Für diesen Versuch wurden NHEMs (Passage 10) aus einer T75-Zellkulturflasche abgelöst (Kap. 4.1.2.1) und gezählt (Kap. 4.1.2.2). Aus der gezählten Suspension wurden 800000 Zellen in 10 ml Medium in die Petrischale gegeben. Die Zellen wurden homogen im Gefäß verteilt und im Inkubator bei 37°C kultiviert. Nach 5 Tagen wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml 4 %-PFA-PBS überschichtet und für 8 min inkubiert. Das 4 %-PFA-PBS wurde abgesaugt und die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen. Es wurden 5 ml 2 %-BSA-PBS mit DAPI (1 mg/ml) im Verhältnis 1:1000 hergestellt und auf die Zellen gegeben. Die Platte wurde für 15 min bei RT inkubiert. Nach verstrichener Zeit wurde das Gemisch abgesaugt und die Zellen 3-ml mit PBS gewaschen. Mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden Aufnahmen der entsprechenden Bereiche gemacht.

4.5.2 Untersuchung des Wachstums von MSCs auf PS

Die MSCs wurden von der Arbeitsgruppe Stammzelltherapie, Abteilung Zelltherapie, Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie ausgesät und zur weiteren Untersuchung übergeben. Die Entwicklung der Zellen wurde am Mikroskop dokumentiert. Es erfolgte ein regelmäßiger Medienwechsel.

4.5.3 Untersuchung des Wachstums von NHEMs auf PP

Die NHEMs wurden aus T75-Zellkulturflaschen (Passage 13) entnommen. Dafür wurden die Zellen abgelöst (Kap. 4.1.2.1) und gezählt (Kap. 4.1.2.2). Pro Platte wurden 600000 Zellen in 5 ml auf die Oberfläche ausgesät. Zur Kultivierung lagerten bei 37 °C im Inkubator. Nach 5 Tagen wurden die Zellen fixiert und mit Propidiumiodid (1 mg/ml) gefärbt. Dafür wurde das Medium abgesaugt, die Platte einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit 3 ml eiskalten Methanol bei -20 °C für 10 min fixiert. Danach wurde das Methanol abgesaugt und die Platten an der Luft getrocknet. Die Platte wurde für 10 min mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,1 %-Saponin-PBS für 10 min behandelt. Im Anschluss wurde das Saponin abgesaugt und die Zellen für 10 min mit 2x SSC äquilibriert. Das 2x SSC wurde entfernt und auf die Zellen 3 ml 2x SSC mit Propidiumiodid (1:3000) gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Die Lösung wurde abgenommen und die Platte 3-mal mit 2x SSC gewaschen. Mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden Bilder aufgenommen.

4.5.4 Untersuchung des Wachstums von NHEMs auf Polyglactin-Fäden

Für diesen Versuch wurden die vorbereiteten Fäden für 15 min in 75 % Ethanol (v/v) getaucht und im Anschluss unter der Sterilbank getrocknet. Die NHEMs (Passage 13) wurden aus einem Zellkulturgefäß abgelöst (Kap. 4.1.2.1) und die Zellzahl bestimmt (Kap. 4.1.2.2). Die Fäden wurden vor dem Aussäen kalibriert. Dafür wurden sie in einem Reaktionsgefäß mit 2 ml 75 % Ethanol (v/v) versetzt und kurz gevortext. Das Ethanol wurde abgesaugt und das Material 2-mal mit 2 ml PCMM gewaschen. Zu dem Faden wurden 100000 Zellen in 1,5 ml PCMM gegeben und für 1 h auf dem Taumler bewegt. Im Anschluss wurden sie eine Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach einem Tag wurden die Fäden von den Reaktionsgefäßen in eine 24-Loch-Platte überführt und mit 1 ml Medium versetzt.

4.6 WST-Analysen

4.6.1 WST-Analyse auf Oberflächen

Für das Experiment wurden die Zellen einer T75-Zellkulturflasche (NHEMs Passage 9, HMs Passage 7) aus dem Gefäß abgelöst (Kap. 4.1.2.1) und gezählt (Kap. 4.1.2.2). In jedes Loch wurden 10000 Zellen in 200 µl Medium ausgesät. Die Zellen wurden über mehrere Tage (NHEMs 12 Tage, HMs 7 Tage), bis zu einer ausreichenden Konfluenz, kultiviert. Nach dieser Zeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 200 µl PBS gewaschen. WST wurde im Verhältnis 1:10 mit DMEM gemischt und 100 µl davon auf die Zellen gegeben. Diese wurden 2 h bei 37 °C mit der Lösung inkubiert. Nach verstrichener Zeit wurden die 100 µl von den Zellen in eine 96-Lochplatte mit U-förmigen Boden überführt. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von 450 nm und 620 nm gemessen.

4.6.2 WST-Analyse auf Scaffolds

In Vorbereitung für das Aussäen der Zellen wurden die Scaffolds kalibriert. Dafür wurden 200 µl 75 % Ethanol (v/v) in jedes Loch gegeben. Das Ethanol wurde abgesaugt und die Scaffolds 2-mal mit 200 µl PCMM-Medium gewaschen. Aus einer T75-Zellkulturflasche wurden die NHEMs (Passage 10) abgelöst (Kap. 4.1.2.1) und die Zellzahl bestimmt (Kap. 4.1.2.2). Auf jedes Scaffold wurden 10000 Zellen in 200 µl PCMM-Medium ausgesät. Zusätzlich wurde auf einer vorbereiteten Polystyrolplatte eine Standardkurve für die Zellzahl ausgesät. Ebenfalls auf der Platte ausgesät wurden 10000 für jede Behandlungsmethode. Dies diente zur Abschätzung des Wachstums der Zellen. Die Analyse der Standardkurve

erfolgte am nächsten Tag. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 200 µl PBS gewaschen. WST wurde im Verhältnis 1:10 mit DMEM gemischt und je 100 µl der Lösung auf die Zellen gegeben. Diese wurden für 2 h im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Nach abgelaufener Zeit wurden die WST-Lösung von den Zellen genommen und in eine neue 96-Lochplatte mit U-förmigen Boden pipettiert. Die Analyse erfolgte im Plattenreader (Multiscan Spektrum) bei einer Wellenlänge von 450 nm und 620 nm als Referenzwellenlänge gemessen. Die Zellen auf den Scaffolds wurden für mehrere Tage (WST_A 4 Tage, WST_B 6 Tage, WST_C 5 Tage) kultiviert. Die Untersuchung der Proliferation erfolgte analog wie bei der Standardkurve mit WST.

4.7 Bestimmung der Melaninproduktion

4.7.1 Bestimmung der Melaninproduktion auf Oberflächen

Für die Überprüfung der Melaninproduktion der Zellen wurden die 6-Lochplatten im Vorfeld mit Laccase behandelt (Kap. 4.2.4). Die Zellen von 2 T75-Flaschen (NHEMs Passage 9, HMs Passage 6) wurden abgelöst (Kap. 4.1.2.1), gezählt (Kap. 4.1.2.2) und in jedes Loch 100000 Zellen in 2 ml Medium ausgesät. Als Vergleich wurde ebenfalls ein Triplikatansatz mit Zellen auf einer plasmabehandelten 6-Lochplatte durchgeführt. Die Platten wurden für eine homogene Verteilung der Zellen geschwenkt und im Inkubator bei 37 °C kultiviert. Es erfolgte ein regelmäßiger Mediumwechsel.

Als die Zellen eine ausreichende Konfluenz (NHEMs 15 Tage, HMs 17 Tage) erreicht hatten, wurden die Zellen aus jedem Loch mit 0,5 ml Trypsin für 4 min behandelt und die gelösten Zellen in separate Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Zellen wurden bei 220 rcf für 4 min zentrifugiert und der Überstand im Anschluss abgesaugt. Die Pellets wurden danach in 120 µl PBS resuspendiert und in Reaktionsgefäße überführt. Aus diesem Volumen wurden jeweils 40 µl Suspension entnommen, in eine 96-Wellplatte gegeben und mit 40 µl Trypanblau vermischt. Die Zellen wurden in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und auf beiden Seiten gezählt (Kap. 4.1.2.2). Die Zellen in den Reaktionsgefäßen wurden mit Hilfe von Trockeneis und Wasserbad (37 °C) fünfmal eingefroren und wieder aufgetaut. Danach wurden alle Gefäße bei 20238 rcf für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 150 µl 1M NaOH lysiert und im Anschluss bei 60 °C für 5 Stunden erhitzt. Die Ansätze wurden in eine 96-Lochplatte mit flachem Boden pipettiert. Zusätzlich wurde eine Standardkurve für die Melaninkonzentration angelegt. Dafür wurde ein Melaninstandard von 100 µg/ml durch eine lineare Verdünnungsreihe bis auf 3,12 µg/ml herabgesetzt (Abbildung 2, S.24). Das Endvolumen betrug ebenfalls 150 µl.

Standardkurve angelegt. Für den Standard wurde synthetisches Melanin mit einer Konzentration von 100 µg/ml als Ausgangskonzentration verwendet. Durch eine lineare Verdünnungsreihe wurde eine Konzentration bis aus 3,12 µg/ml erstellt. Sowohl die Kontrolle als auch die Standardkurve hatten ein Endvolumen von 150 µl. Die Extinktionswerte der Proben wurden im Plattenreader bei einer Wellenlänge von 475 nm ermittelt.

4.8 Immunfluoreszenz

4.8.1 Immunfluoreszenz von NHEMs auf PS-Scaffolds

Für die Immunfluoreszenz wurden 2 12-Loch-Scaffolds in 4 kleine Quadrate zerschnitten und in einen ChamberSlide ausgelegt. Es erfolgte die Behandlung je eines Scaffolds mit 400 µl Kaffeesäure (0,15 µM), Dopamin (0,15 µM) sowie Phosphatpuffer (0,2 M, pH 7) und 15 µl Laccaselösung (2 mg/ml). Sie inkubierten für 2 h auf dem Taumler bei 100 rpm. Nach abgelaufener Zeit wurden die Lösungen abgesaugt und das Polystyrol 2-mal mit VE-Wasser gespült. Ein Scaffold blieb unbehandelt. Vor dem Aussäen der Zellen wurden die Scaffolds kalibriert. Hierfür wurden 200 µl 75 % Ethanol (v/v) auf das Polystyrol pipetiert und für 10 min bei RT inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt und 2-mal mit je 200 µl PCMM gewaschen. Eine T25-Zellkulturflasche NHEMs (Passage 12) wurde trypsinisiert (Kap. 4.1.2.1) und die Zellen gezählt (Kap. 4.1.2.2). Auf jedes Scaffold wurden 10000 Zellen in 200 µl PCMM ausgesät. Die Zellen wuchsen für 8 Tage auf den Scaffolds. Für die Färbung wurde das Medium abgesaugt und die NHEMs mit 300 µl eiskaltem Methanol für 10 min bei -20 °C fixiert. Das Methanol wurde abgesaugt und die Reste bei RT trocknen gelassen. Es erfolgten ein kurzer Waschschrift mit 500 µl PBS und ein weiterer Waschschrift mit PBS-0,1 %-Triton X 100 für 10 min auf dem Taumler. Das PBS wurde entfernt und das Scaffold mit 400 µl 2 %-BSA-PBS-0,1 %-Triton X 100 überschichtet. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT auf dem Taumler wurde die Lösung entfernt und das Scaffold mit dem primären Antikörper von NKI/beteb (0,1 mg/ml). Hierfür wurden 400 µl Blockpuffer mit dem Antikörper im Verhältnis 1:50 vermischt und auf die Zellen gegeben. Scaffold und Antikörper reagierten über Nacht bei 4 °C. Ab diesem Zeitpunkt wurde bei wenig Licht weiter verfahren. Nach einem Tag wurde der Antikörper abgesaugt und das Scaffold 2-mal für 5 min auf dem Taumler mit PBS-0,1 %-Triton X 100 gespült. Die Waschlösung wurde abgesaugt und 400 µl des biotinylierten Sekundärantikörpers zugesetzt der für 1 h bei RT auf dem Taumler inkubierte. Der sekundäre Antikörper wurde dafür in Blockpuffer im Verhältnis 1:400 gelöst. Nach Absaugen des Antikörpers wurde das Scaffold erneut 2-mal für 5 min mit PBS-0,1 %-Triton X100 auf dem Taumler gespült. Es erfolgte die letzte

Behandlung mit dem Fluoreszenzantikörper Alexa Fluor® 594 (1 mg/ml) und DAPI (1 mg/ml). Der Antikörper wurde dafür im Verhältnis 1:400 zum Blockpuffer zugesetzt und DAPI im Verhältnis 1:1000. Die Inkubation dieser Lösung erfolgte für 1 h bei RT auf dem Taumler. Das Scaffold wurde 3-mal mit 400 µl PBS auf dem Taumler gewaschen und im Anschluss auf einen Objektträger fixiert. Zur Fixierung wurde das Scaffold auf einem Objektträger gelegt und mit Fluoromount übergossen. Als Letztes wurde ein Deckglas aufgelegt. Das Präparat trocknete für einen Tag bei RT.

4.8.2 Immunfluoreszenz von NHEMs auf Polyglactin-Fäden

Nach 8 Tagen Kultivierung wurden die Zellen fixiert. Dafür wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml eiskaltem Methanol bei -20 °C für 10 min fixiert. Das Methanol wurde abgesaugt und der Faden an der Luft getrocknet. Er wurde im Anschluss einmal für 10 min mit PBS-0,1 %-Triton X100 gewaschen. Die Zellen wurden danach mit 1 ml 2 %-BSA-PBS-0,1 %-Triton X 100 bedeckt und für eine Stunde auf dem Taumler bewegt. Im Anschluss folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper. Hierfür wurden der Antikörper NKI/beteb (1 mg/ml) mit 2 %-BSA-PBS-0,1 %-Triton X 100 im Verhältnis 1:50 gemischt und auf jeden Faden 1 ml gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht. Die Lösung wurde abgesaugt und der Faden 2-mal für 5 min mit PBS-0,1 %-Triton X100 gewaschen. Es folgte eine Inkubation für eine Stunde bei RT mit dem biotinylierten Antikörper in 2 %-BSA-PBS-0,1 %-Triton X 100 im Verhältnis 1:400. Danach wurden die Fäden 2-mal für 5 min mit PBS-0,1 %-Triton X 100 gewaschen. Die letzte Inkubation erfolgt mit dem Fluoreszenzantikörper Alexa Fluor® 647 und DAPI. Der Antikörper wurde mit 2 %-BSA-PBS-0,1 %-Triton im Verhältnis 1:400 und DAPI im Verhältnis 1:1000 vermischt. Die Inkubation dauerte 1 h bei RT. Die Fäden wurden 3-mal mit PBS gewaschen. Vor der Immunfluoreszenz wurden die Fäden auf einem Objektträger mit Fluoromount und einem Deckglas fixiert. Die Probe trocknete über Nacht bei RT.

5 Ergebnisse

Die im folgenden Abschnitt werden Ausdrücke wie Kaffeesäure mit Laccase, L-DOPA mit Laccase, Dopamin mit Laccase, Puffer mit Laccase, unbehandelt sowie Plasma verwendet. Diese beziehen sich darauf, dass die verwendeten Oberflächen und Scaffolds mit dem jeweiligen Substrat und Laccase behandelt wurden, Plasmabehandelt sind oder die Oberflächen oder Scaffolds keine Behandlung vor ihrer Verwendung erfahren haben.

5.1 Wachstum von NHEMs auf PS

Die höchsten Werte an Zellen erreichen in dieser Abbildung (Abbildung 3 S.28) L-DOPA mit Laccase und Dopamin mit Laccase. Beide erreichen ein ähnliches Ergebnis auch beim Vergleich der Standardabweichungen (Stabw.) Eine genauere Differenzierung zwischen diesen Behandlungen ist nicht möglich. Das nächste größere Ergebnis erreicht Kaffeesäure mit Laccase. Durch eine höhere Stabw kommt es unter anderem zu Überschneidungen mit allen Modifikationen außer der unbehandelten Fläche. Der Wert ist daher ziemlich unstabil. Die kleinste Anzahl an Zellen wurde auf der unbehandelten Oberfläche erreicht. Die Stabw überschneidet sich mit dem Ergebnis des nächst höheren Wertes von Dopamin ohne Laccase. Dieser liegt auf sehr nah bei Puffer mit Laccase. Puffer mit Laccase besitzt eine sehr hohe Streuung.

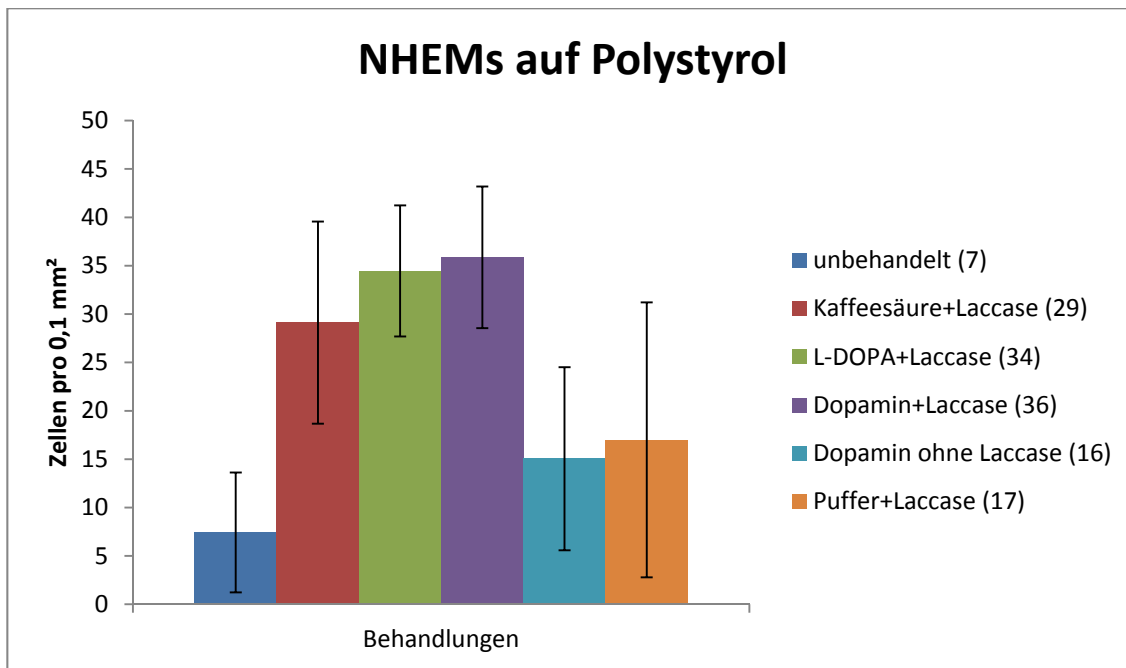


Abbildung 3 Ausgezählte NHEMs pro 0,1 mm² auf einer PS-Platte

5.2 Wachstum von MSCs auf PS

Bei den auf den Ausschnitten (Abbildung 4 S.29) erkennbaren Zellen handelt es sich um MSCs auf einer Unterlage aus Polystyrol, die 2 Tage nach dem Aussäen dokumentiert wurden. Die Aufnahmen haben eine 10-fache Vergrößerung. Die Zellen auf Ausschnitt A wuchsen auf einer Oberfläche die im Vorfeld mit Kaffeesäure und Laccase behandelt wurde. Die Zellen sind auf dem Untergrund adhärent und haben sich flächig ausgebreitet. Sie besitzen eine annähernd dreieckige Form. Die MSCs, die auf der Oberfläche zu erkennen sind, die mit L-DOPA und Laccase (C) behandelt wurde sind vollständig adhärent. Es ist ein Rand zu erkennen, der den Ausschnitt in zwei Teile spaltet, einen mit mehreren flächigen Zellen und einen mit fast keinen MSCs. Die Zellen auf der unbehandelten Oberfläche (D) sind spindelförmig und mit einer nur kleinen Fläche mit dem Untergrund verbunden. Es befinden sich nur wenige Zellen auf der fotografierten Fläche. MSCs auf einer mit Dopamin und Laccase behandelten Oberfläche (B) wachsen mit einer vergleichbar hohen Dichte. Die Zellen wachsen flach und dreieckig. Es ist eine Zweiteilung des Ausschnittes zu erkennen. Eine Zweiteilung des Bildes ist ebenfalls bei der mit Puffer und Laccase behandelten Fläche zu erkennen (E). Ein Teil ist nicht besiedelt, der andere Teil ist mit flachen, dreieckigen MSCs bewachsen.

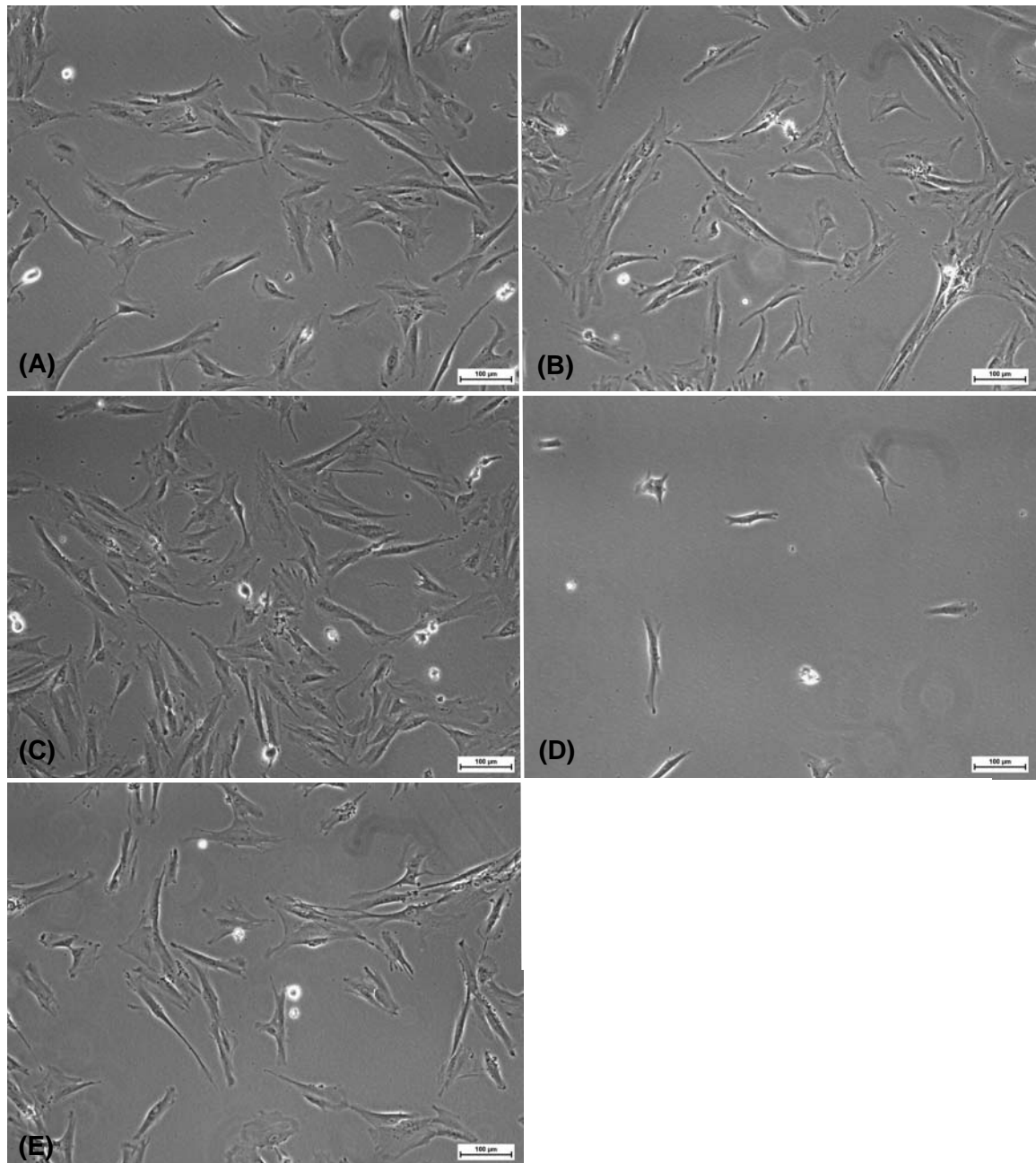


Abbildung 4 Phasenkontrastaufnahme von MSCs auf einer PS-Platte, (A) Kaffeesäure mit Laccase, (B) Dopamin mit Laccase, (C) L-DOPA mit Laccase, (D) unbehandelt, (E) Puffer mit Laccase, Aufnahme in 10x Vergrößerung

Die MSCs wurden ebenfalls nach 3 Tagen mit einer 10-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die Zellen (Abbildung 5 S.30), die auf der mit Kaffeesäure und Laccase behandelten Oberfläche (A) wuchsen, haben eine hohe Dichte erreicht. Sie wachsen flach, zum Teil enger zusammen. Eine fast vollständige Konfluenz haben die Zellen mit Hilfe von Dopamin und Laccase erreicht (B). Die MSCs wachsen flach in starker Nachbarschaft aber auch gedrungener. Das Selbe ist auch bei dem Ausschnitt zu erkennen, der vorher mit L-

DOPA und Laccase behandelt wurde (C). Die MSCs auf der unbehandelten Fläche sind eher dünn vorhanden. Zum Teil mit annähernd dreieckiger Form (D). Auf Puffer und Laccase behandelter Oberfläche wachsen die Zellen mit zunehmender Konfluenz. Sie haben dabei eine flache und dreieckige Morphologie (E).

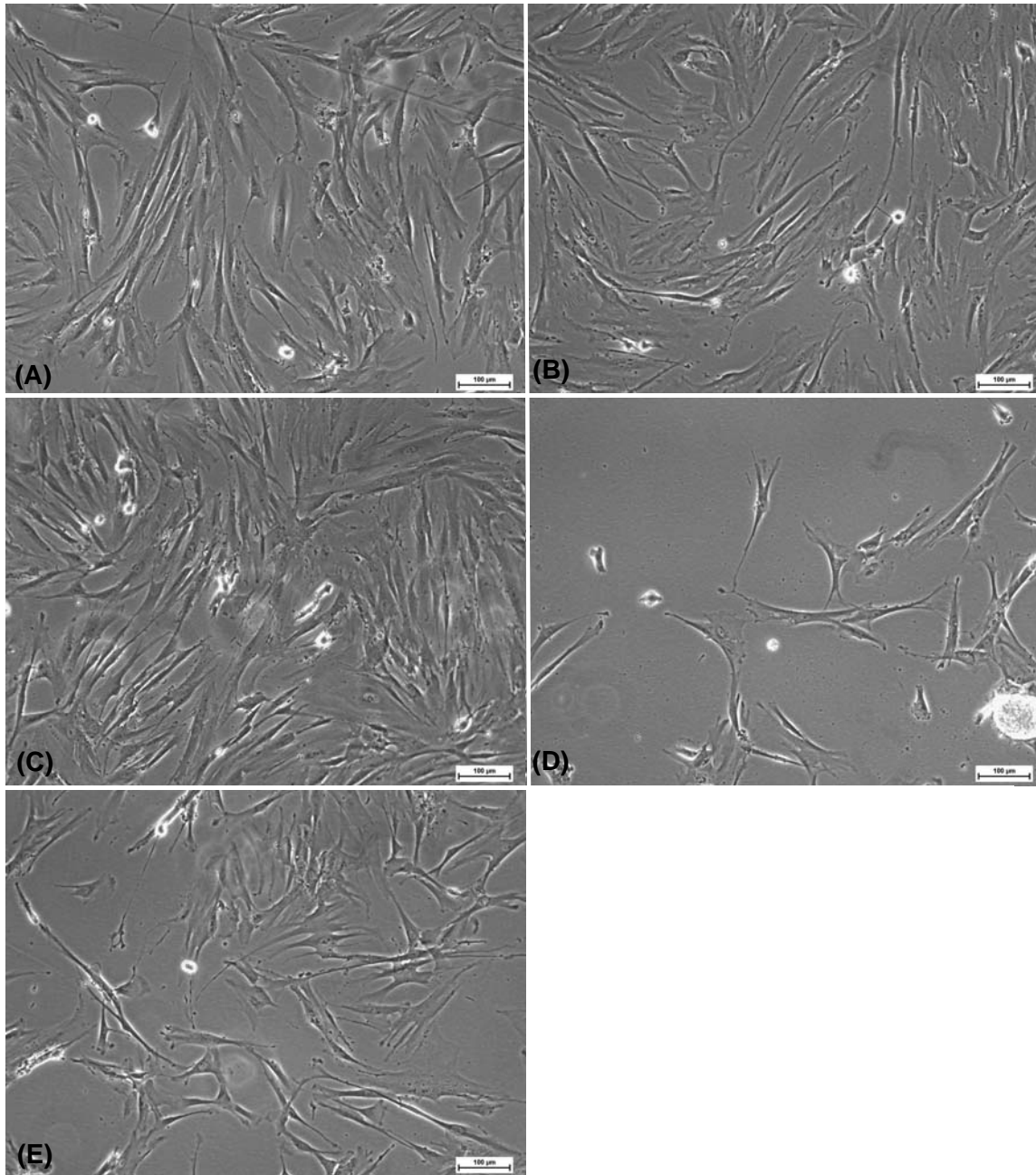


Abbildung 5 Phasenkontrastaufnahme von MSCs auf einer PS-Platte, (A) Kaffeesäure mit Laccase, (B) Dopamin mit Laccase, (C) L-DOPA mit Laccase, (D) unbehandelt, (E) Puffer mit Laccase, Aufnahme in 10x Vergrößerung

5.3 Wachstum von NHEMs auf PP

Auf den folgenden Bildern (Abbildung 6 S.32) sind NHEMs auf PP-Platten zu erkennen. Die befinden sich in Passage 11 und wurden einen Tag vorher auf die Oberfläche ausgesät. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die Zellen auf Bild B, wuchsen auf einer Fläche, die mit Dopamin und Laccase vorbehandelt wurde. Die NHEMs auf dem modifizierten Untergrund sind fast komplett adhärent und haben in nächster Nachbarschaft zu anderen Zellen zwei oder mehr Dendriten ausgebildet. Ab der Mitte, dem Übergang zum unbehandelten Material, nimmt die Menge der angehafteten Zellen wieder ab. Auf der unbehandelten Fläche (D) sind fast alle Zellen nicht adhärent, sondern liegen abgekugelt im Medium vor. Die NHEMs, die am Untergrund haften sind sehr klein und haben eine spindelförmige Gestalt. Auf der mit Puffer und Laccase behandelten Oberfläche (E) sind zum überwiegenden Teil abgekugelte Zellen zu finden. Die die an der Platte adhäriert sind, sind klein und bipolar. Die Zellen auf dem Ausschnitt, der mit Kaffeesäure und Laccase (A) behandelt wurde, sind zur Hälfte adhärent. Die NHEMs die nicht abgekugelt vorliegen, haben sich ausgebreitet und liegen bipolar vor. Die NHEMs auf der Platte, die mit L-DOPA und Laccase (C) modifiziert wurde wuchsen, sind vollständig an der Oberfläche angehaftet. Sie haben sich ausgebreitet und liegen zum größten Teil bipolar vor.

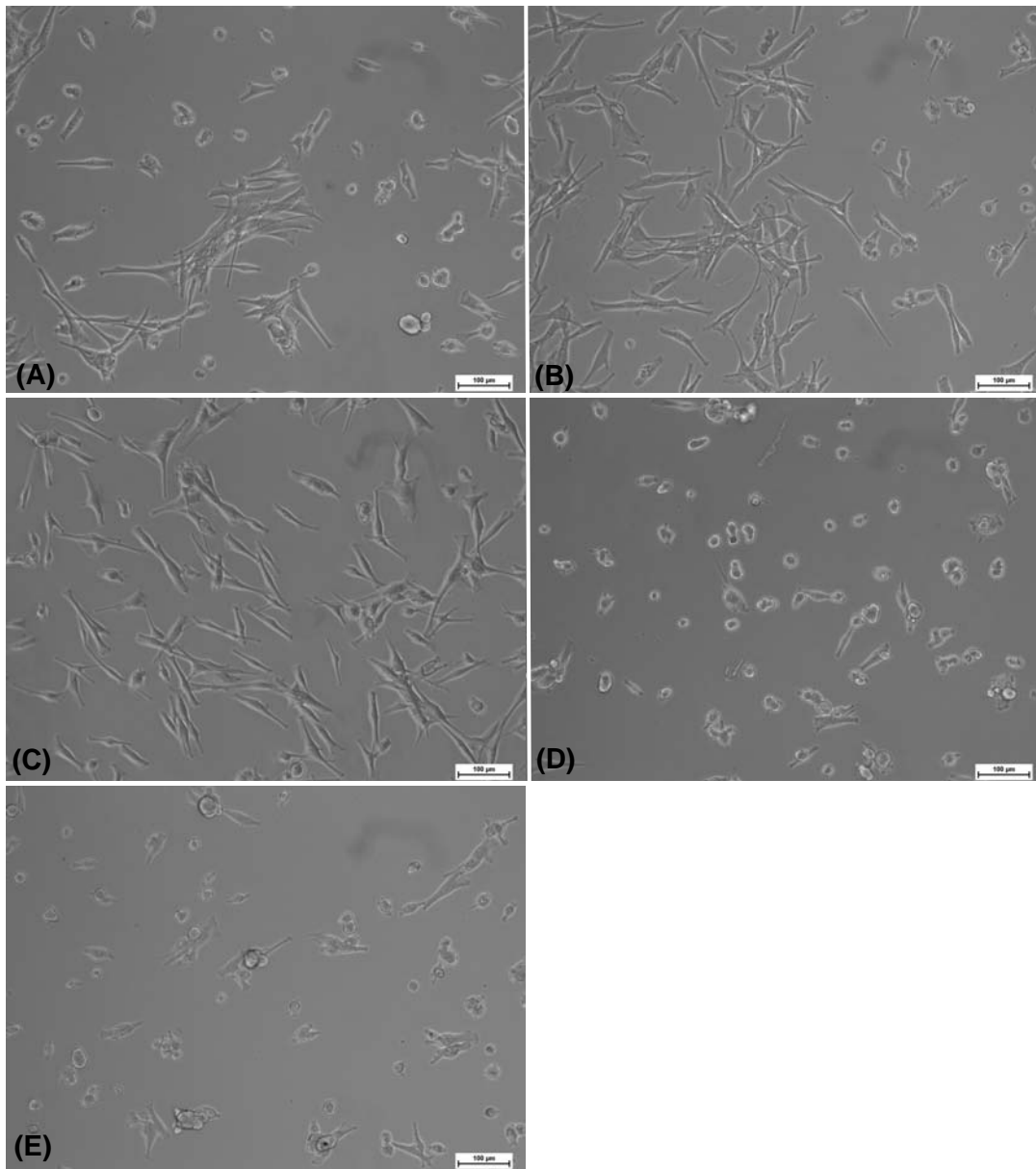


Abbildung 6 Phasenkontrastaufnahme von NHEMs auf einer behandelten PS-Platte, (A) Kaffeesäure mit Laccase, (B) Dopamin mit Laccase, (C) L-DOPA mit Laccase, (D) unbehandelt, (E) Puffer mit Laccase, Aufnahmen in 10x Vergrößerung

Die Zellen wuchsen auf den Platten für 6 Tage. Sie wurden fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Zur Quantifizierung wurden sie fixiert, mit PI gefärbt und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops ausgezählt (Abbildung 7, S.33).

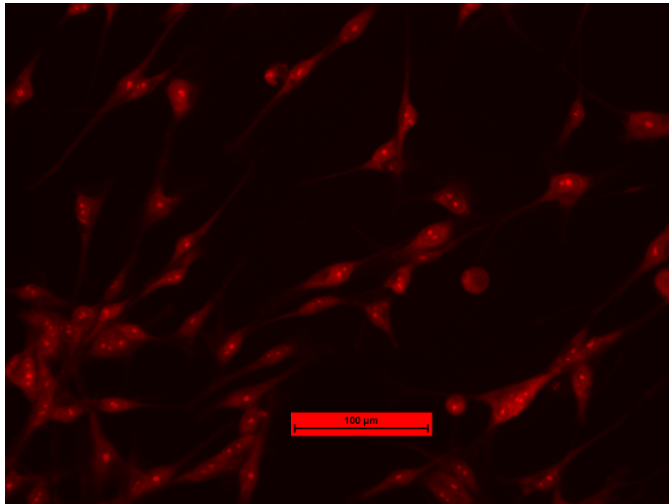


Abbildung 7 Immunfluoreszenzaufnahme von NHEMs auf PP, Färbung: Propidiumiodid, Aufnahme in 20x Vergrößerung

Die Abbildung (Abbildung 8, S.34) zeigt die gezählten angefärbten Zellen auf einer Fläche von 0,1 mm². Auf der Fläche mit der Behandlung mit Kaffeesäure und Laccase konnten rund 19 Zellen gezählt werden. Bei L-DOPA und Laccase rund 44 Zellen, Dopamin und Laccase rund 41 Zellen, Puffer und Laccase rund 7 Zellen. Auf der unbehandelten Fläche waren rund 9 Zellen vorhanden.

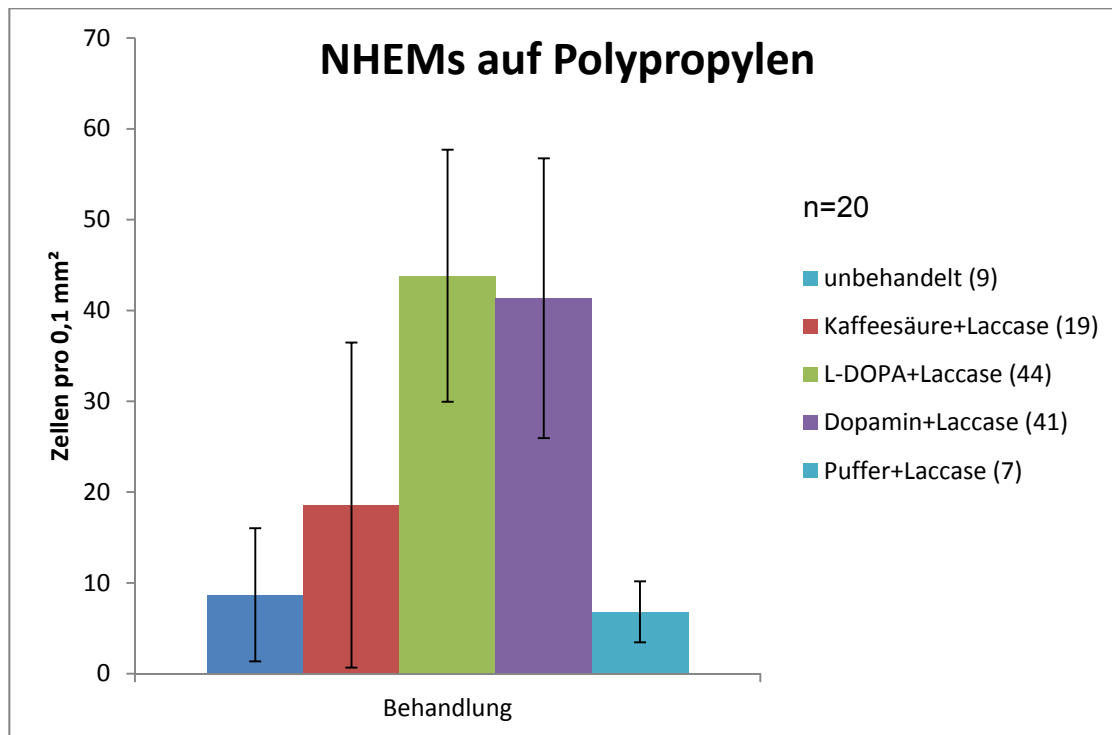


Abbildung 8 Ausgezählte NHEMs pro 0,1 mm² auf einer PP-Platte

5.4 Immunfluoreszenz

5.4.1 Immunfluoreszenz von NHEMs auf PS-Scaffolds

Ausschnitt (A) zeigt eine tripolare Zelle. Bei (B) ist eine großflächige Zelle mit mehreren Dendriten zu erkennen. Ausschnitt (C) zeigt Zelle mit drei Fortsetzen. Alle Bilder sind 2-fach gefärbt. Zu erkennen ist im blauen Kanal der mit DAPI gefärbte Zellkern. Der rote Kanal zeigt die angefärbten Melanosomen (Abbildung 9, S.35).

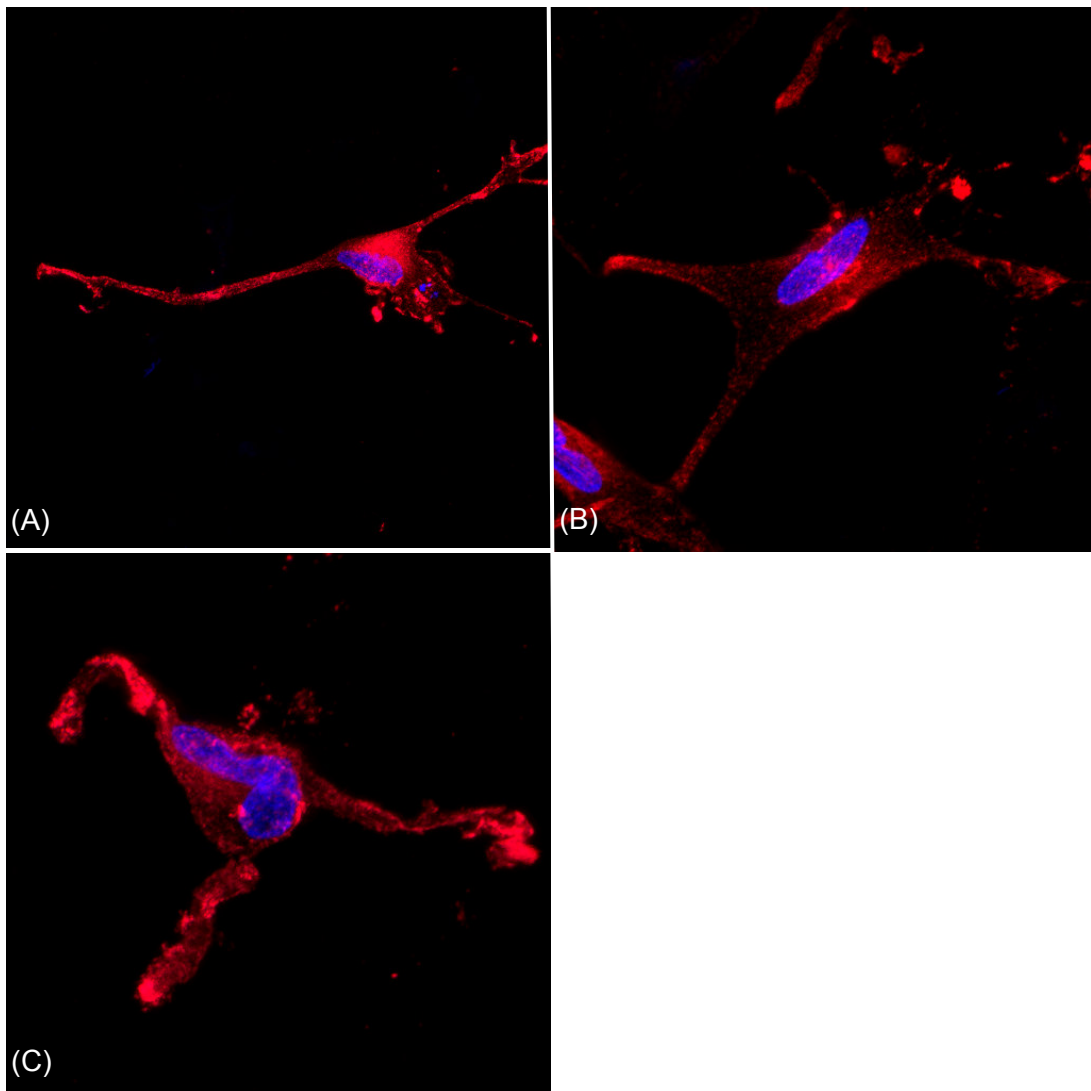


Abbildung 9 Immunfluoreszenzaufnahmen am LSM von NHEMs im PS-Scaffold die mit NKI/beteb und DAPI gefärbt wurden, 68x Vergrößerung

5.4.2 Immunfluoreszenz von NHEMs auf Polyglactin-Faden

Das Bild (A) zeigt angefärbte NHEMs auf einem Faden aus Polyglactin-Faden. Die Bilder (B) und (C) zeigen ebenfalls NHEMs auf einem Stück Faden. Die Ausschnitte wurden

zusätzlich am Rechner nachbearbeitet. Im blauen Kanal zu sind die Zellkerne zu erkennen. Der rote Kanal zeigt die gefärbten Melanosomen der Zellen. Im grünen Kanal ist der autofluoreszierende Polyglactin-Faden zu erkennen (Abbildung 10, S.36).

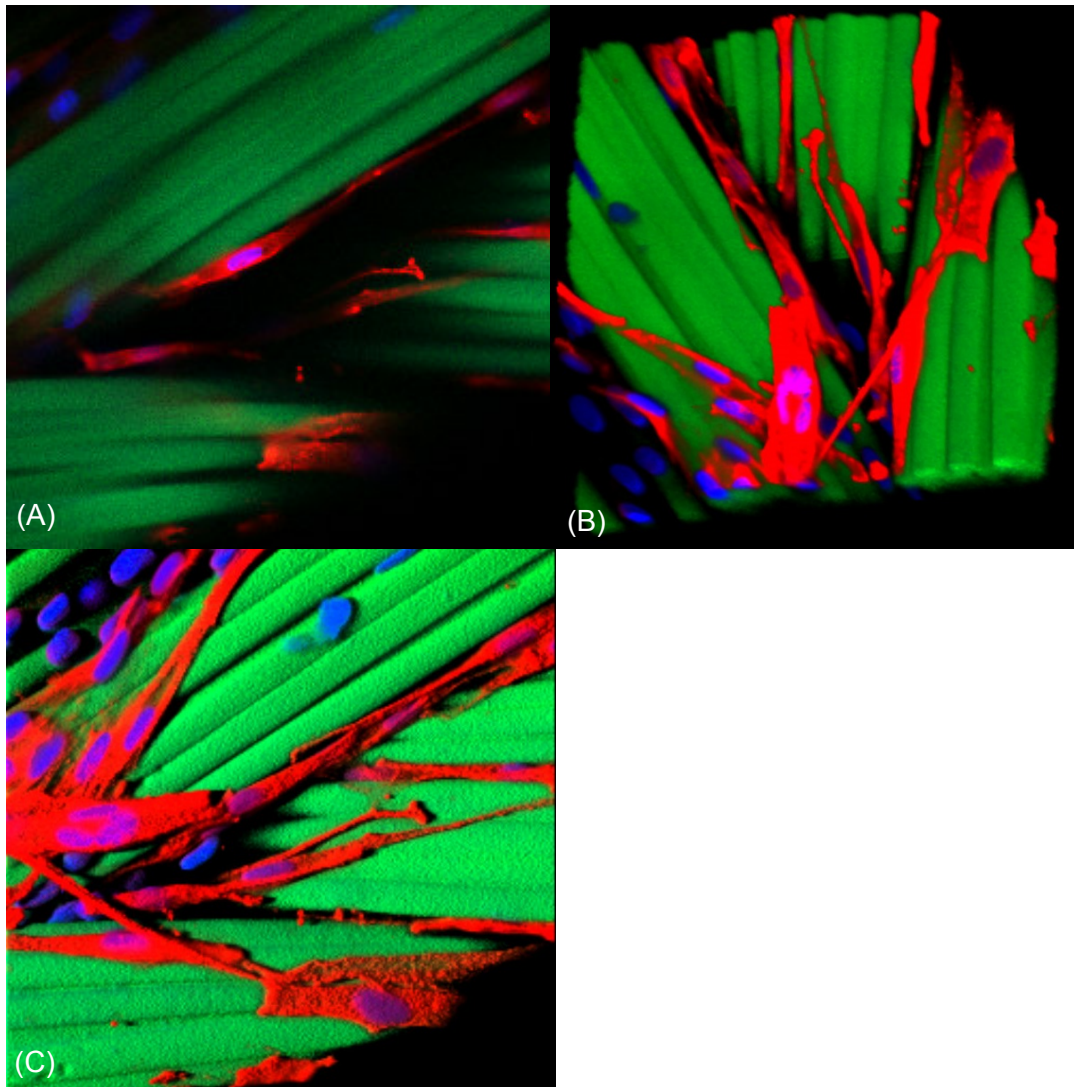


Abbildung 10 Immunfluoreszenzaufnahmen am LSM von NHEMs auf Polyglactin-Faden die mit NK1/beteb und DAPI gefärbt wurden, Autofluoreszenz des Fadens, 68x Vergrößerung

5.5 WST-Analyse

5.5.1 WST-Analyse mit NHEMs auf PS-Oberflächen

Im Diagramm (Abbildung 11, S.37) ist erkennbar, dass die Behandlung mit L-DOPA und Laccase den höchsten Wert bewirkt. Die Stabw ist jedoch relativ groß, sie fällt damit auch in die Bereiche von Kaffeesäure mit Laccase, Dopamin mit Laccase und Plasma. Bei diesen drei Varianten liegen die Extinktionswerte auf einem fast gleichen Niveau. Auch zwi-

schen ihren Stabw kommt es zu Überlappungen. Es ist somit nicht feststellbar, welcher dieser Behandlungen die besten Resultate erzielt. Bei ungefähr der Hälfte des L-DOPA-Wertes liegt Puffer mit Laccase mit einer kleinen Sabw, die sich mit keiner anderen überlappt. Fast 4-mal so klein wie der größte Wert des Diagramms ist die Extinktion bei der unbehandelten Fläche. Auch hier ist eine kleine Stabw vorhanden, bei der es zu keiner Überschneidung kommt.

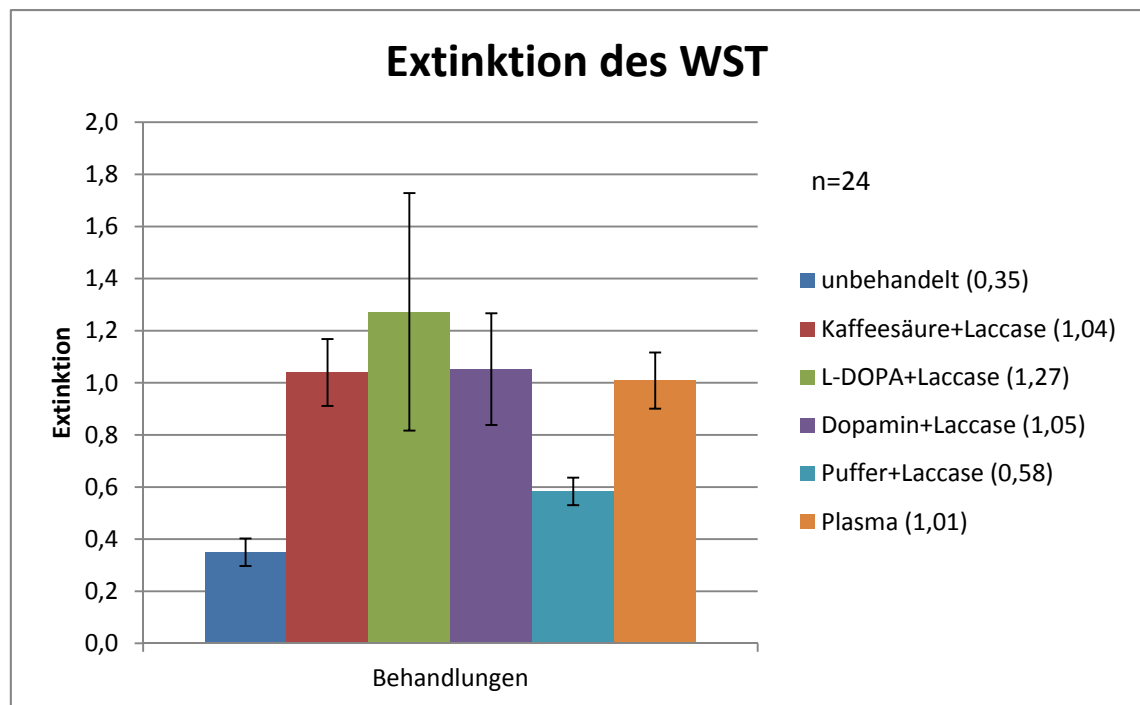


Abbildung 11 MW und Stabw der Extinktionswerte des WST von NHEMs auf einer behandelten 96-Lochplatte

5.5.2 WST-Analyse mit HMs auf PS-Oberflächen

Die Extinktionen bei diesem Versuch (Abbildung 12, S.38) zeigen, dass die Behandlung der Oberflächen höhere Werte der gesamten mitochondriellen Aktivität mit sich bringt. Das beste Ergebnis erzielt dabei Kaffeesäure mit Laccase, kurz dahinter liegen Dopamin mit Laccase, Plasma und L-DOPA mit Laccase. Mit der Behandlung durch Puffer und Laccase liegen sie alle auf einem ähnlichen Niveau. Durch die Überschneidungen ihrer Stabw lässt sich zudem keine Aussage über bessere oder schlechtere Ergebnisse treffen. Zudem sind alle deutlich größer als der Wert der unbehandelten Oberfläche. Die Stabw von Puffer mit Laccase und unbehandelt kommen sich dabei aber sehr nah.

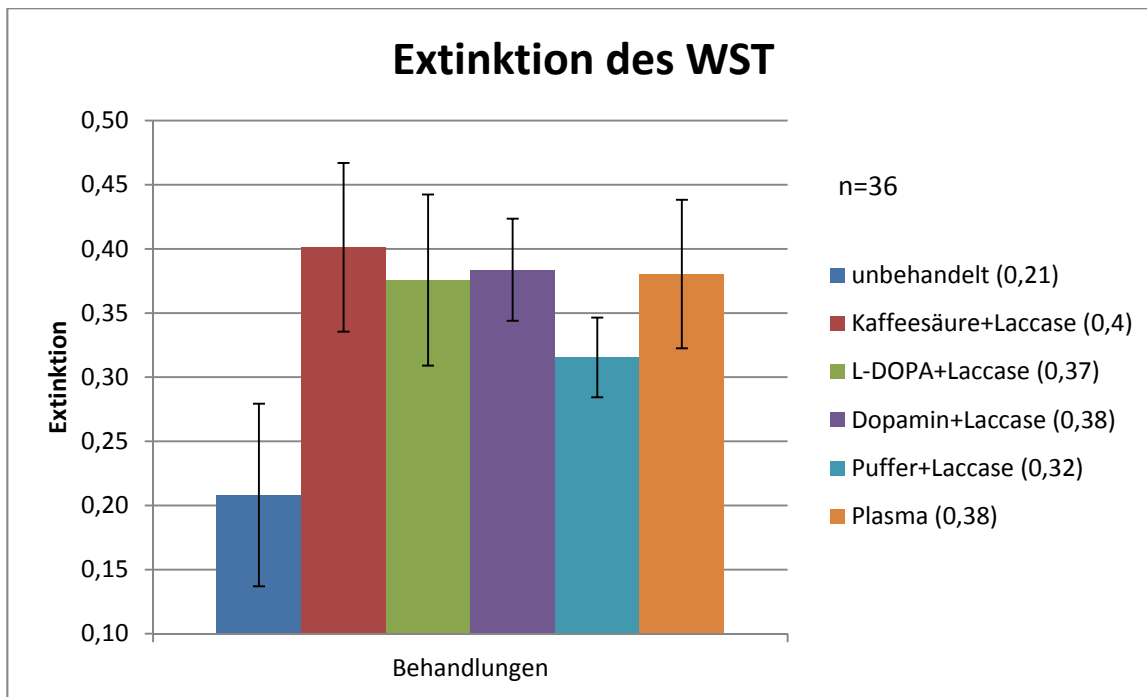


Abbildung 12 MW und Stabw der Extinktionswerte des WST von HMs auf einer behandelten 96-Lochplatte

5.5.3 WST-Analyse mit NHEMs auf PS-Scaffolds

Die Werte die bei den Messungen für die Standardkurven (Abbildung 13, S.39) entstanden zeigen, dass alle Regressionen, bis auf Puffer mit Laccase denselben Anstieg besitzen. Mit steigender Anzahl der Zellen nehmen auch die WST-Messungen im selben Maße zu. Prinzipiell entsprechen die Signale also der Zellzahl im Loch. Die annähernd doppelt so großen Werte, die mit den Substraten und Laccase erreicht wurden, lassen einen Vorteil dieser schließen.

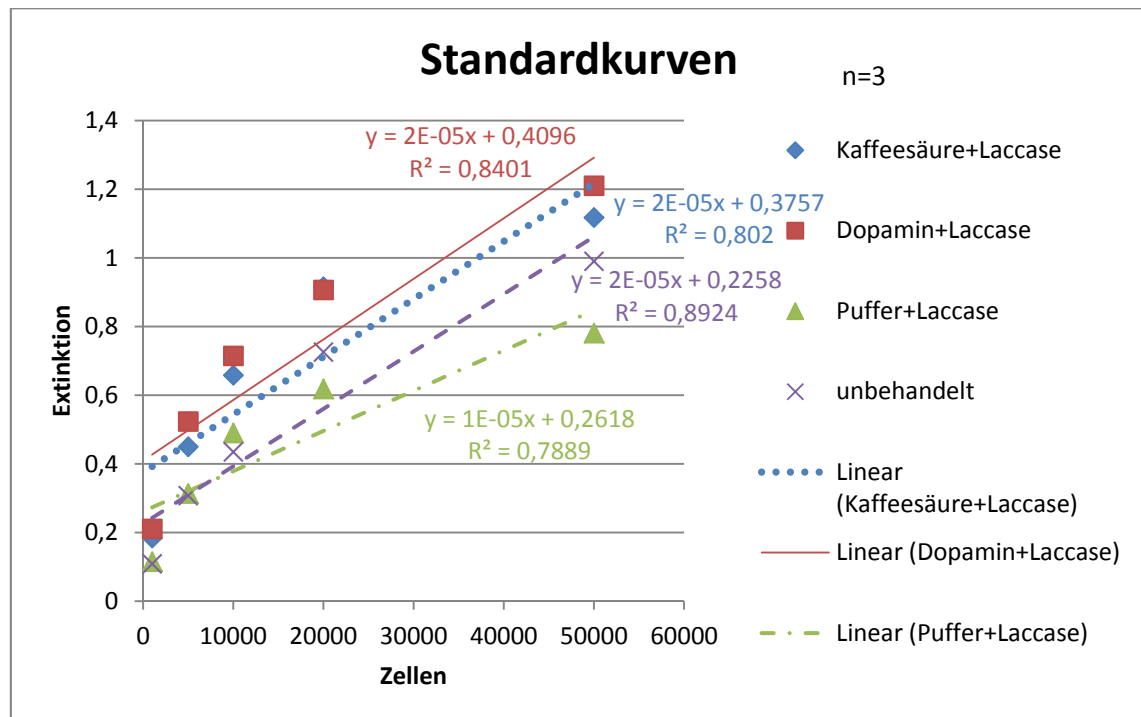


Abbildung 13 Extinktionswerte aus einer WST-Analyse zur Bestimmung einer Standardkurve von NHEMs auf behandelten PS-96-Lochplatten

Die Untersuchung der Extinktionswerte dieses Versuches (Abbildung 14, S.40) zeige, dass die gesamte mitochondriale Aktivität bei den Zellen auf Flächen die mit Puffer und Laccase behandelt sind den größten Wert besitzt, danach folgen die Zellen, die auf der unbehandelten Oberfläche wuchsen. Die kleinsten Werte erreichen die Modifikationen mit Kaffeesäure und mit Dopamin. Die Ausmaße der Standardabweichungen aller vier Varianten führen zu einer Überschneidung der Werte. Es ist somit keine Aussage über Vorteile eines der Behandlungsarten möglich.

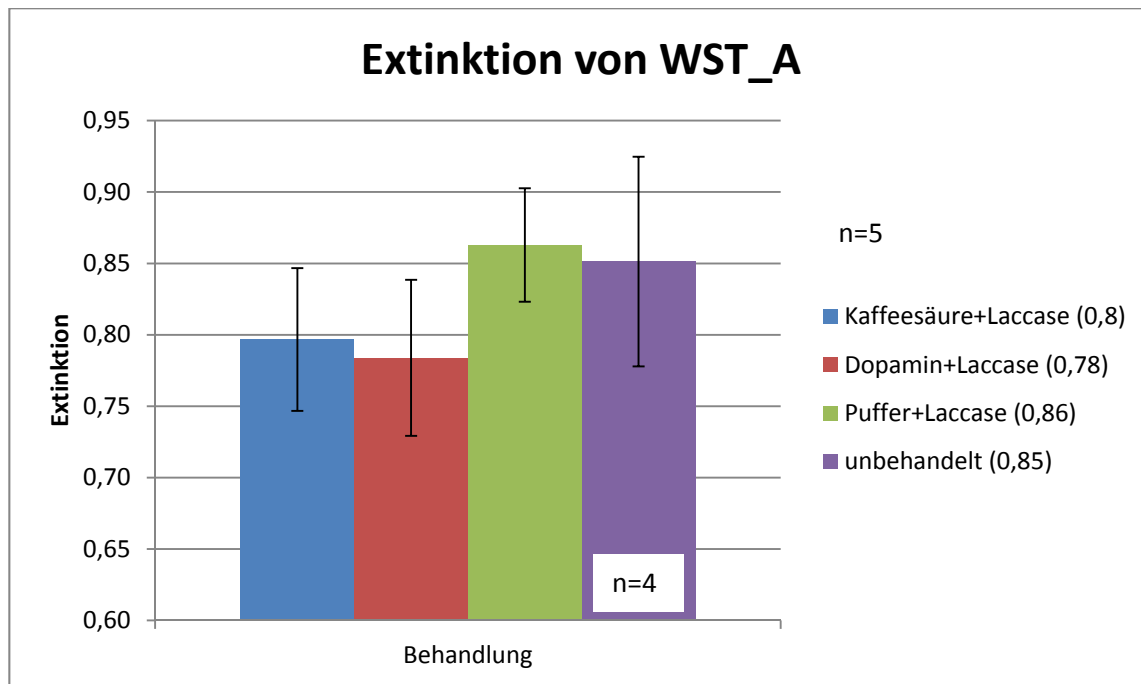


Abbildung 14 MW und Stabw von Extinktionswerten der WST-Analyse A, NHEMs auf PS-Scaffolds

Die Ergebnisse des folgenden Versuches (Abbildung 15, S.41) zeigen deutlich bessere Resultate bei der unbehandelten Fläche. Der Wert ist 3-mal so groß wie die Extinktion bei Kaffeesäure und Laccase. An zweiter Stelle kommt Puffer und Laccase, dessen Wert immer noch doppelt so hoch ist wie bei Kaffeesäure und Laccase. Eine Behandlung mit Dopamin und Laccase bringt nur eine geringfügige Verbesserung verglichen mit Kaffeesäure und Laccase. Da sich ihre Stabw jedoch überlagern, ist hier kein deutlicher Unterschied feststellbar. Im Gegensatz dazu kann bei unbehandelt und Puffer mit Laccase ein signifikante Differenz festgestellt werden. Sowohl unter diesen Beiden, als auch in der Gegenüberstellung mit den Modifikationen mit Substraten.

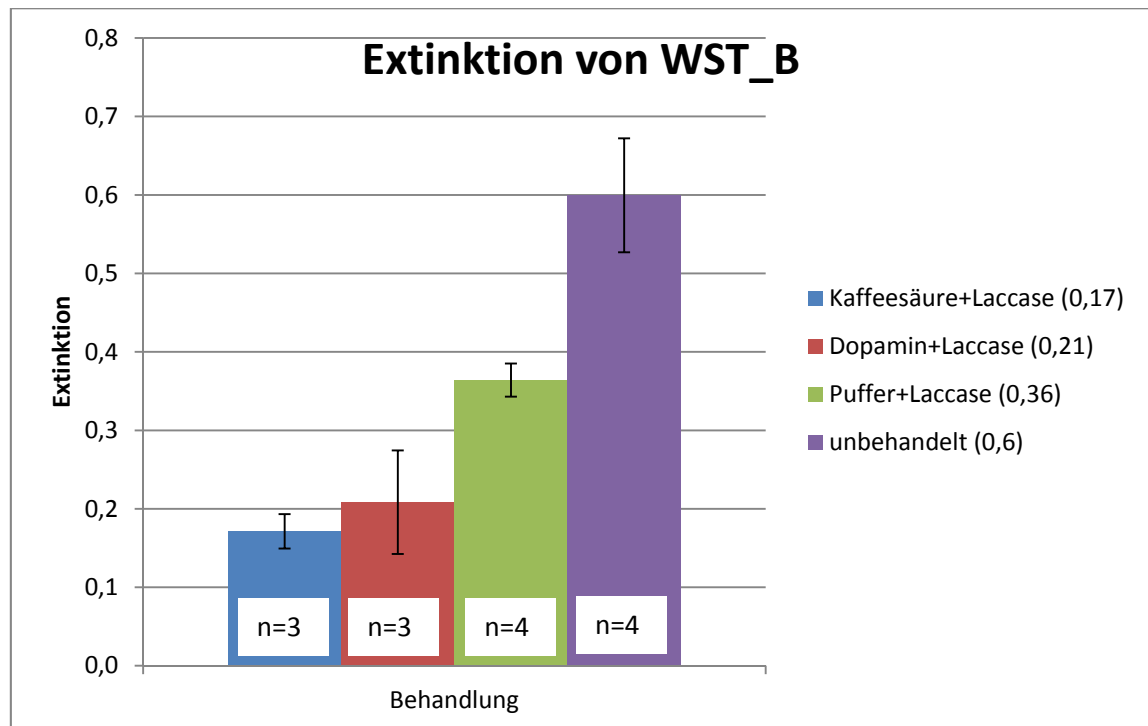


Abbildung 15 MW und Stabw von Extinktionswerten der WST-Analyse B, NHEMs auf PS-Scaffolds

Bei diesem Experiment (Abbildung 16, S.42) besitzt Puffer und Laccase den größten Extinktionswert und somit die größte mitochondrielle Aktivität. Einen mehr als halb so kleinen Wert und damit das schlechteste Resultat erzielt Dopamin mit Laccase. Auch Kaffeesäure mit Laccase mit einer halb so großen Extinktion, liegt deutlich darunter. Die Stabw. der drei führenden Behandlungen lässt keine klare Differenzierung zwischen ihnen zu. Der einzige klare Unterschied ist zwischen Dopamin mit Laccase und Puffer mit Laccase erkennbar.

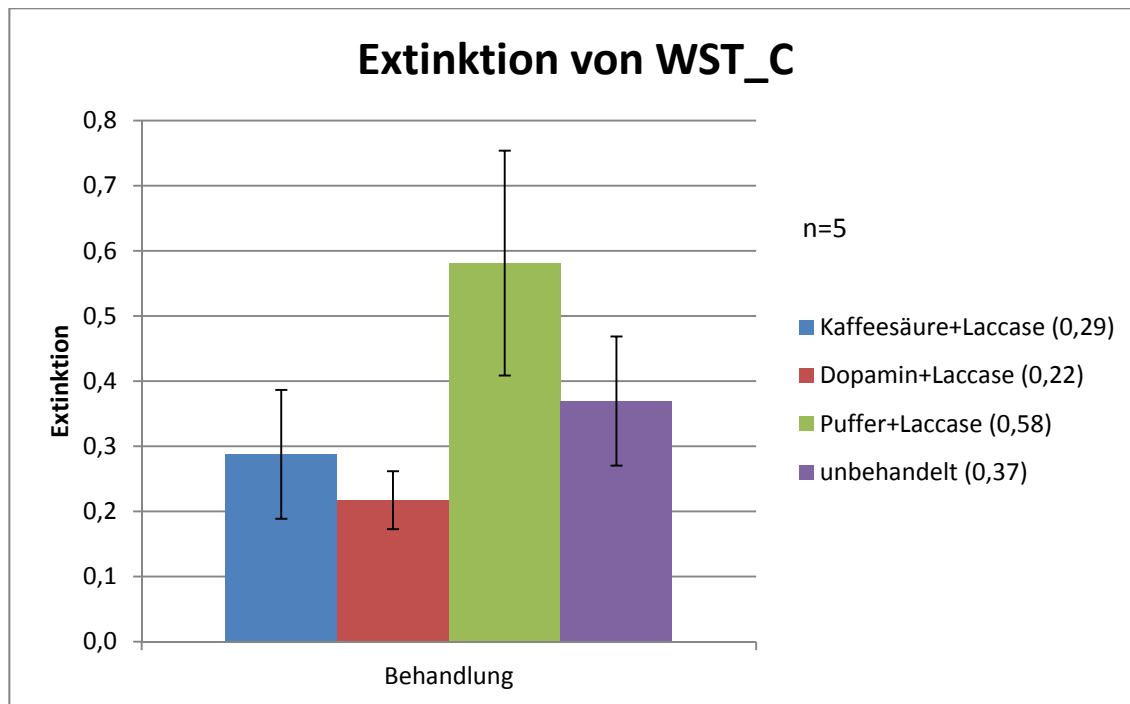


Abbildung 16 MW und Stabw von Extinktionswerten der WST-Analyse C, NHEMs auf PS-Scaffolds

In der Abbildung (Abbildung 17, S.43) deutlich erkennbar, ist der sehr hohe Wert von Puffer mit Laccase. Er ist 3-mal so groß, wie der kleinste Wert von Dopamin und Laccase und doppelt so hoch wie der zweitgrößte Wert von der unbehandelten Fläche. Kaffeesäure mit Laccase ist nur unwesentlich größer als Dopamin mit Laccase. Auch ihre Standardabweichungen überschneiden sich. Zwischen diesen Behandlungen ist kein Unterschied festzustellen. Die Standardabweichung der Zellen der unbehandelten Fläche überschneidet sich mit keiner anderen. Der Wert ist aussagekräftig. Auch die Abweichung von Puffer und Laccase überschneidet sich weder mit Dopamin und Laccase noch mit unbehandelt.

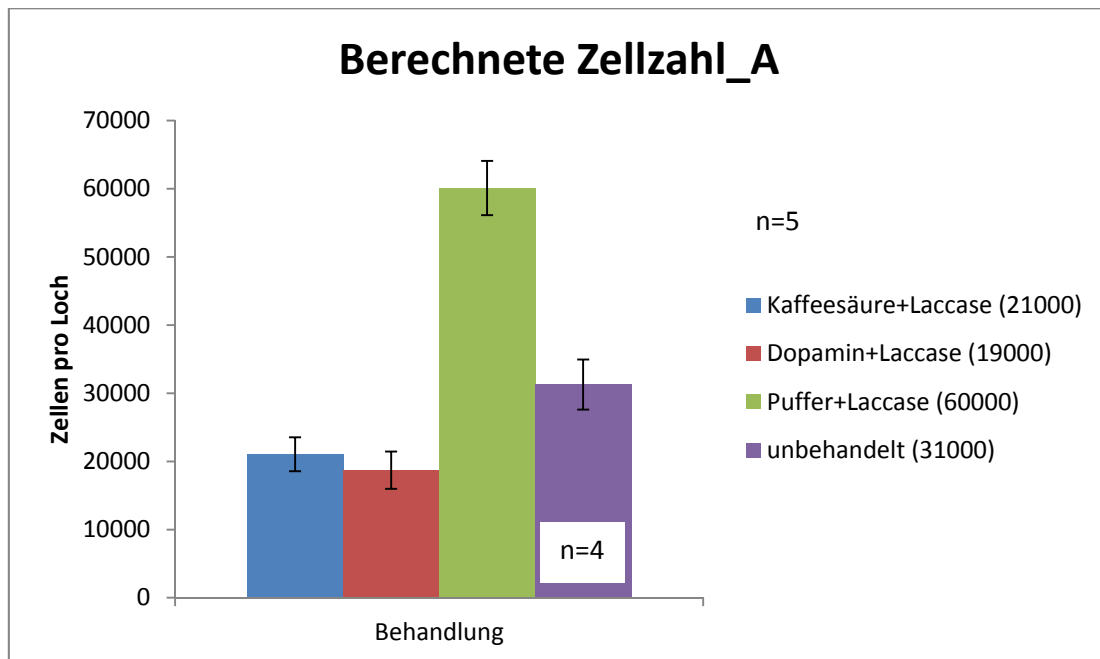


Abbildung 17 Berechnete Anzahl der Zellen der WST-Analyse A mit Hilfe der Standardkurve

Das Diagramm (Abbildung 18, S.43) zeigt eine hohe Zellzahl bei der unbehandelten Oberfläche. Sie ist fast doppelt so groß wie die Anzahl der Zellen bei Puffer mit Laccase. Die Standardabweichungen lassen auf einen signifikanten Unterschied schlussfolgern. Es gibt keine Werte für Zellzahl von Kaffeesäure mit Laccase und Dopamin mit Laccase da mit Hilfe der Standardkurven der jeweiligen Behandlung keine Werte berechnet werden konnten

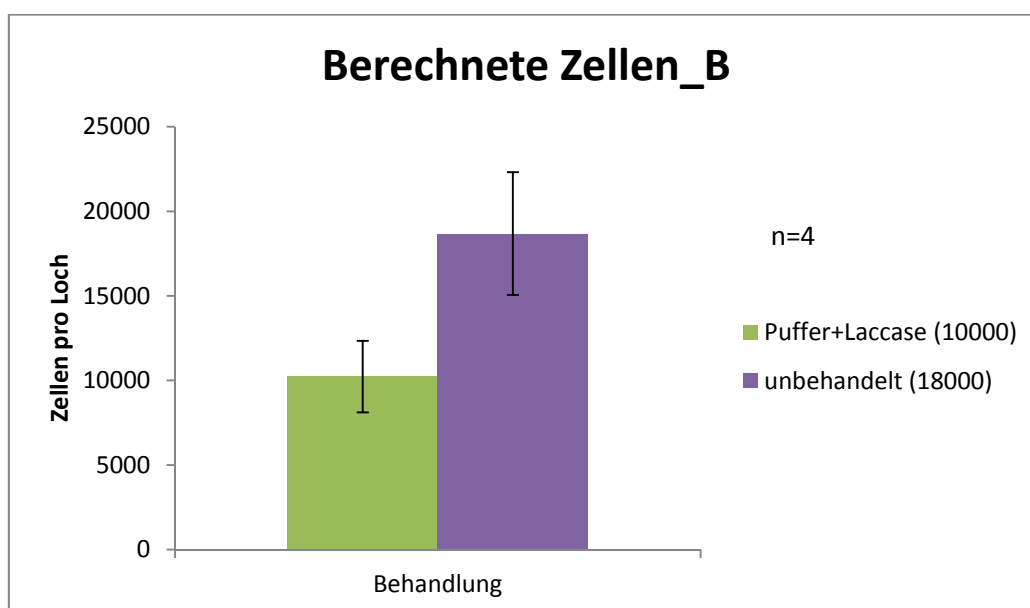


Abbildung 18 Berechnete Anzahl der Zellen der WST-Analyse B mit Hilfe der Standardkurve

In dem Diagramm (Abbildung 19, S.44) scheint der Vorteil einer Behandlung bei Puffer mit Laccase zu liegen. Es sind 4-mal so viele Zellen vorhanden als bei der unbehandelten Oberfläche. Der große Wert von Puffer mit Laccase ist allerdings mit einer sehr großen Standardabweichung behaftet und könnte so um fast um die Hälfte des eigentlichen Wertes schwanken. Trotz dieser großen Abweichung, kommt es zu keinen Überschneidungen mit dem anderen Wert. Puffer und Laccase bringt in diesem Fall den größeren Vorteil.

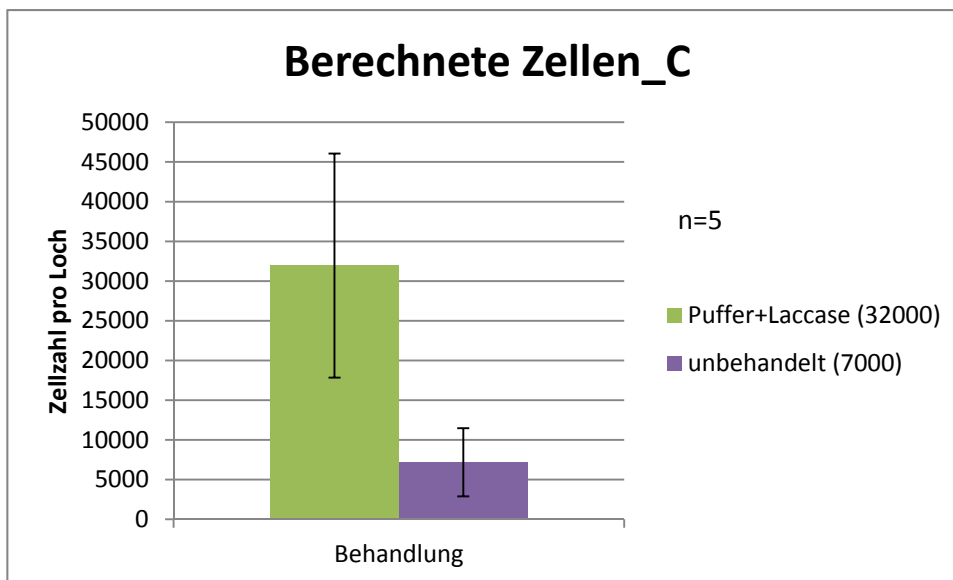


Abbildung 19 Berechnete Zellzahl der Zellen der WST-Analyse C mit Hilfe der Standardkurve

5.6 Bestimmung der Melaninproduktion

5.6.1 Melaninproduktion von NHEMs auf PS-Oberflächen

Die Abbildung (Abbildung 20, S.45) zeigt eine erhöhte Zahl der Zellen bei allen Behandlungen mit Substraten und Laccase sowie Plasma. Den größten Wert erreicht L-DOPA mit Laccase. Zu Überschneidungen kommt es nur mit Plasma, hier ist keine präzise Aussage möglich. Dagegen lässt sich eine deutlich bessere Wirkung im Vergleich zu den anderen Substraten, nur zur Laccase und der unbehandelten Fläche schlussfolgern. Die Stabw von Dopamin mit Laccase reicht nach unten sehr nah an Kaffeesäure mit Laccase heran. Die Beiden könnten also sehr ähnliche Effekte haben. Auch hier kommt eine Überschneidung mit Plasma zustande. Kaffeesäure mit Laccase erzeugt einen sehr stabilen Wert mit einer sehr kleinen Stabw. Auch das Ergebnis des unbehandelten PS sicher. Durch die die Abweichung von Puffer mit Laccase, kommen sich die Werte jedoch relativ nahe. Trotzdem kann von einem kleinen Vorteil auf Seiten von Puffer mit Laccase ausgegangen werden.

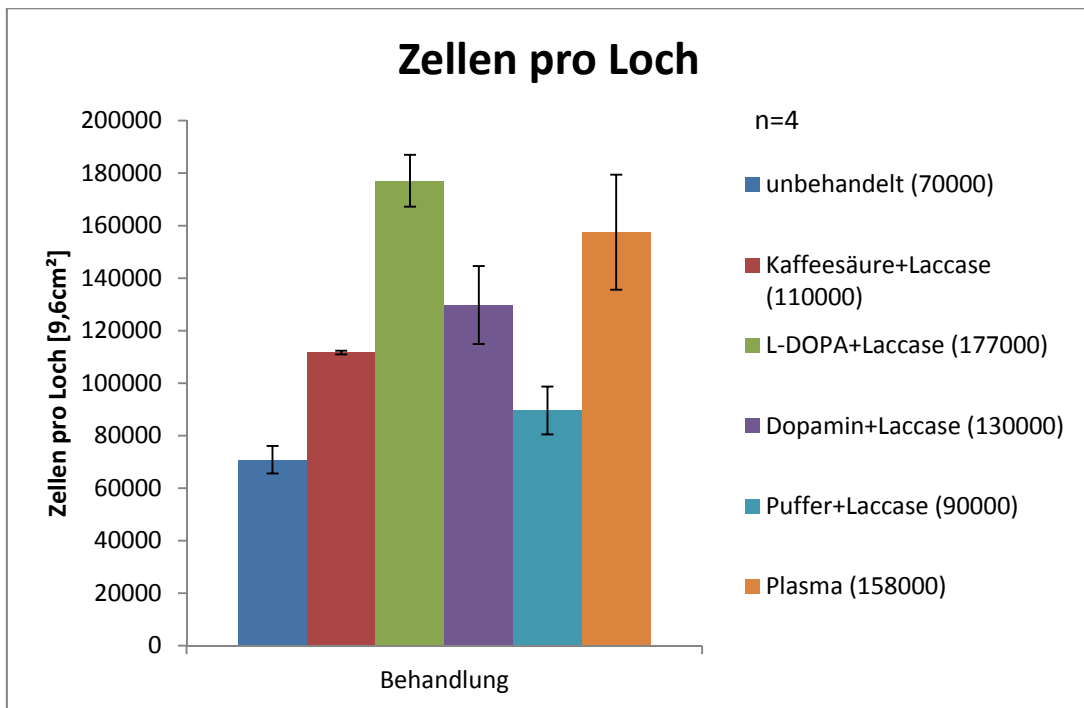


Abbildung 20 MW und Stabw der Anzahl an gezählten NHEMs in einer PS-6-Lochplatte (Lochfläche 9,6 cm²)

Mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,9971 ist die Gerade aussagekräftig.

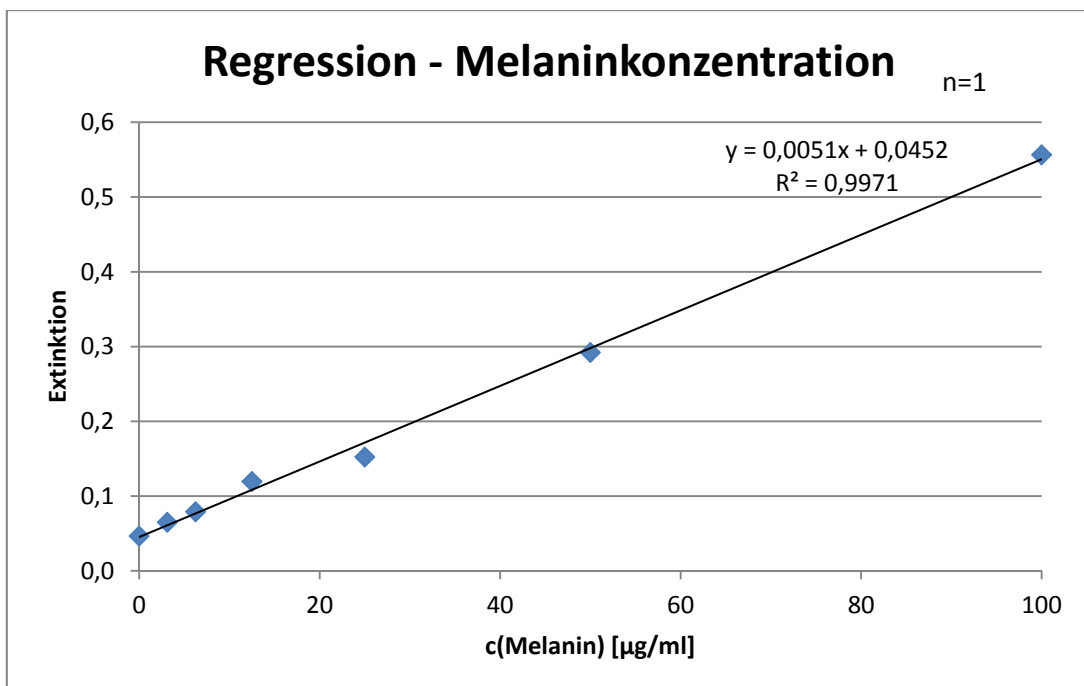


Abbildung 21 Standardkurve aus der Verdünnungsreihe des synthetischen Melanins für den Versuch NHEMs in einer PS-6-Lochplatte

Auffällig bei dieser Abbildung (Abbildung 22, S.46) sind die Werte der unbehandelten Flächen und der Flächen die mit Puffer und Laccase behandelt wurden. Bei Beiden fällt die Stabw in den negativen Bereich ab. Im Rahmen des Messfehlers muss davon ausgegangen werden, dass hier kein Melanin produziert wurde. Den höchsten Wert erreichte in diesem Versuch L-DOPA mit Laccase. Er verliert jedoch durch seine relativ große Stabw einen Teil seiner Position, da es zu Überschneidungen mit Dopamin und Laccase kommt. Auch bei Plasma ist das Resultat durch die große Streuung nicht stabil. Nach unten kann die Konzentration fast bis auf null fallen. Es überschneidet sich zudem mit jedem anderen Wert des Diagrammes. Ein in sich sicheres Ergebnis stellt Kaffeesäure mit Laccase dar.

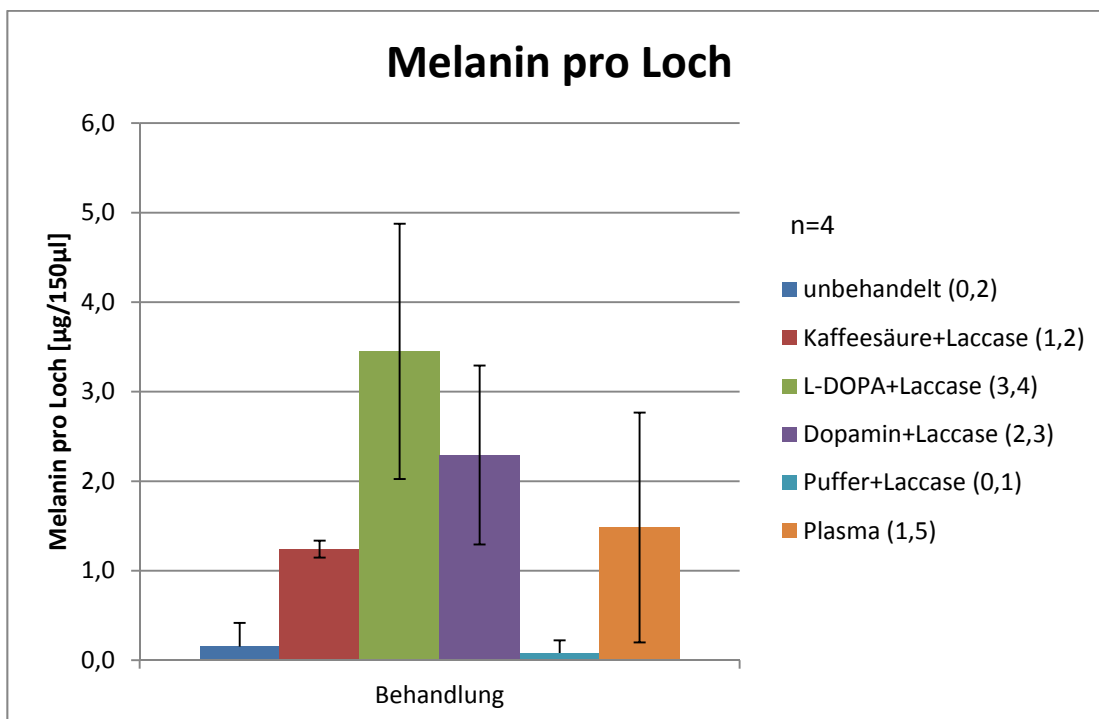


Abbildung 22 Berechnete Menge Melanin in 150 μl Lysat von NHEMs in PS-6-Lochplatten

Die Analyse des Diagrammes (Abbildung 23, S.47) zeigt, dass die Behandlung mit L-DOPA und Laccase sowie Dopamin und Laccase zwar die höchste Menge Melanin pro Zelle erreichen aber die großen Standardabweichungen auf keine stabilen Werte schließen lässt. Zwar können die Konzentrationen noch um einiges steigen, allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass sie auf das Niveau von Kaffeesäure mit Laccase fallen. Dieser Wert ist sehr stabil. Die Stabw von Plasma hingegen gleicht der der ersten Beiden Behandlungsvarianten. In bestimmten Fällen könnte der Wert sogar bis auf kurz vor null fallen, was so gut wie keiner Melaninproduktion der Zelle entspricht. Die Mengen an Melanin bei der unbehandelten Oberfläche und Puffer mit Laccase sind zum einen sehr klein, zum

anderen reichen ihre Stabw bis in den negativen Bereich. Es ist davon auszugehen, dass sie Melaninproduktion gegen null geht oder sogar kein Melanin produziert wird.

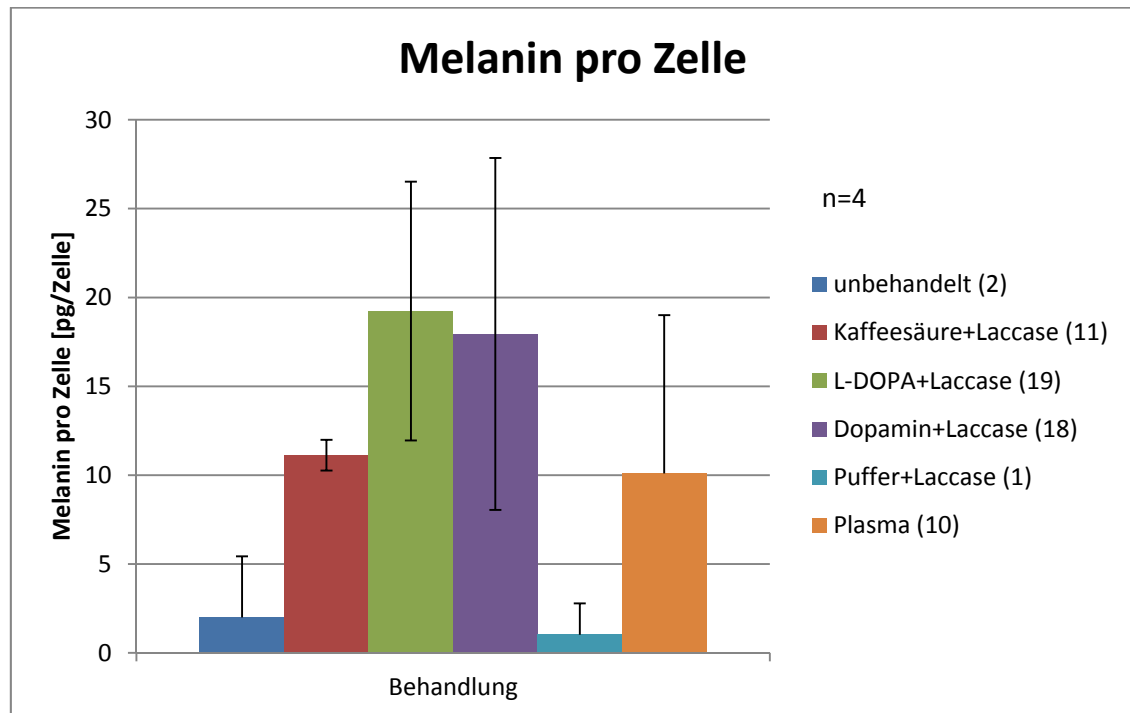


Abbildung 23 Berechnete Menge Melanin pro Zelle von NHEMs in PS-6-Lochplatte

5.6.2 Melaninproduktion von HMs auf PS-Oberflächen

Das Diagramm (Abbildung 24, S.48) Abbildung 24 zeigt, dass im Vergleich zur unbehandelten Oberfläche alle verwendeten Modifikationen zu einer erhöhten Zellzahl im Loch führen. Da jedoch die Werte sehr dicht beieinander liegen, sind durch die Stabw keine genaueren Aussagen möglich. Die Abweichung von Puffer mit Laccase ist zudem so groß, dass die Möglichkeit besteht, dass diese Modifikation nur eine kleine Verbesserung im Vergleich mit der unbehandelten Fläche bringt. Alle anderen Werte liegen deutlich über dem nativen PS. Der Wert der nicht modifizierten Oberfläche ist nur unter Vorbehalten zu betrachten, hierbei handelt es um Ergebnisse, die nur aus zwei Ausgangswerten generiert wurden.

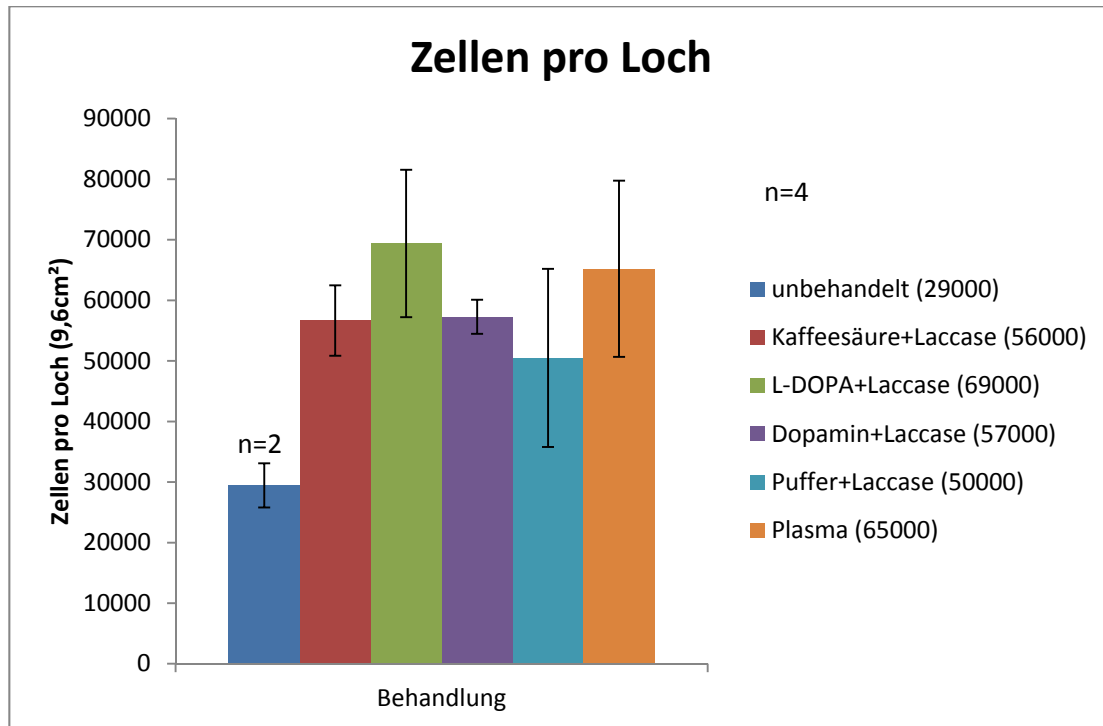


Abbildung 24 MW und Stabw der Anzahl an gezählten HMs in einer PS-6-Lochplatte (Lochfläche 9,6 cm²)

Mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9846 ist die Gerade aussagekräftig.

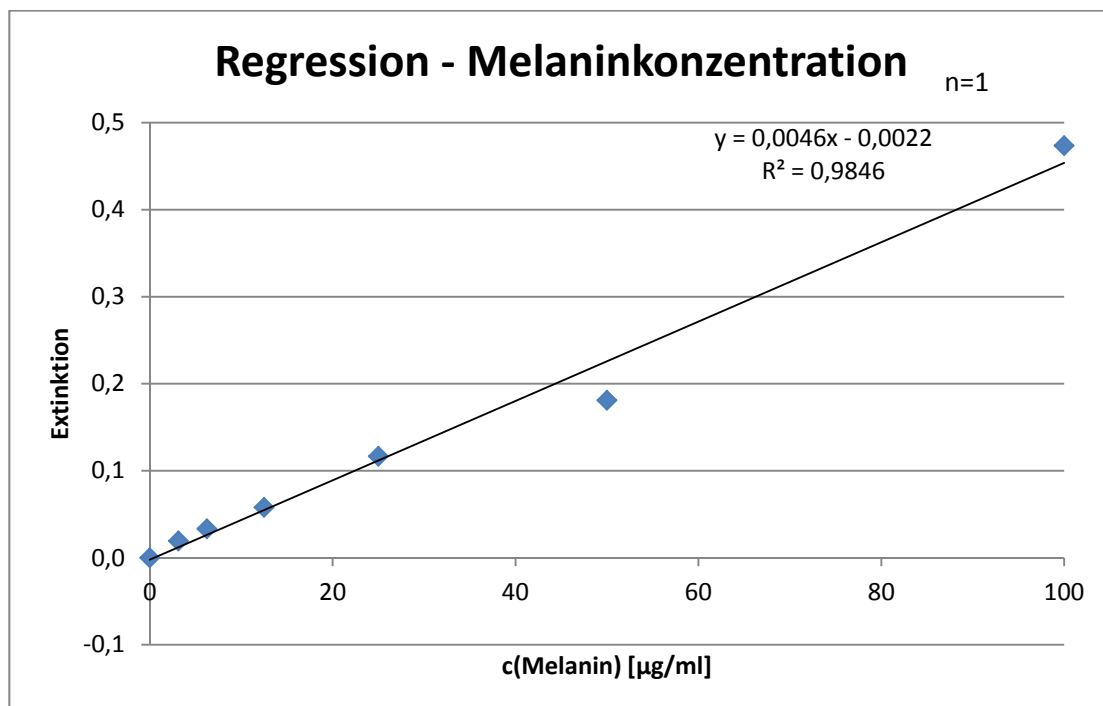


Abbildung 25 Standardkurve aus der Verdünnungsreihe des synthetischen Melanins für den Versuch HMs in einer PS-6-Lochplatte

Die Behandlungen der Oberfläche zeigen eine Erhöhung der Extinktion (Abbildung 26, S.49). Ein Vergleich von Kaffeesäure und Laccase mit L-DOPA und Laccase sowie Dopamin und Laccase ist nicht möglich, da ihre Stabw ineinander übergehen. Es ist jedoch ein Unterschied zwischen L-DOPA mit Laccase und Dopamin mit Laccase festzustellen. Zweiteres zeugt eine höhere Extinktion. Puffer mit Laccase erreicht bei diesem Versuch den kleinsten Wert, der sich deutlich von den anderen Behandlungsvarianten unterscheidet. Plasma und die unbehandelte Oberfläche bewegen sich auf einem ähnlichen Niveau, wobei keine signifikanten Unterschiede festzustellen sind. Es ist zu beachten, dass der Mittelwert der unbehandelten Oberfläche nur auf zwei Ausgangswerten beruht und das Resultat in diesem Falle eher fragwürdig zu betrachten ist.

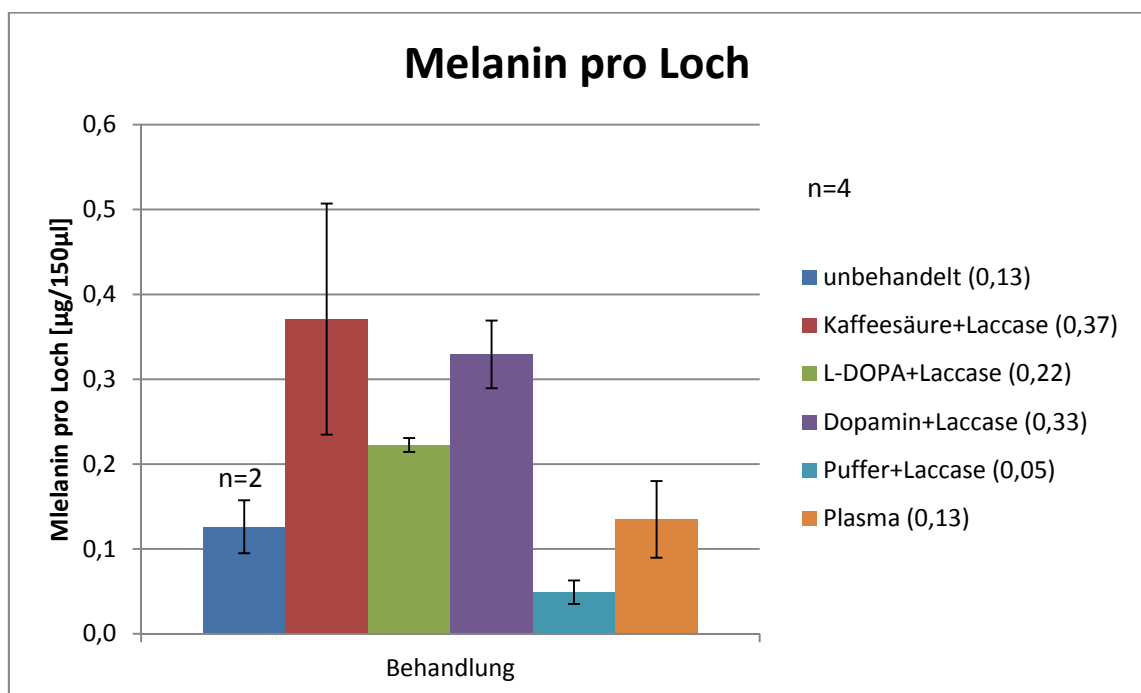


Abbildung 26 Berechnete Menge Melanin in 150 µl Lysat von HMs in PS-6-Lochplatten

Die in der Abbildung (Abbildung 27, S.50) aufgetragenen Werte von Puffer mit Laccase und Plasma reichen mit ihren Stabw bis in den negativen Bereich. Da diese Resultate extrem unstabil sind, können sie in diesem Zusammenhang bestenfalls qualitativ bewertet werden. Die Gegenüberstellung der verbliebenen Ergebnisse zeigt ein sehr ähnliches Niveau der Werte. Bei den Stabw kommt es überall zu Überschneidungen, wodurch keine Aussage über Vorteile getroffen werden können. Da die Durchschnittswerte bei der unbehandelten Oberfläche nur aus zwei Datenpunkten bestehen, ist das Ergebnis nur unter Vorbehalten zu betrachten.

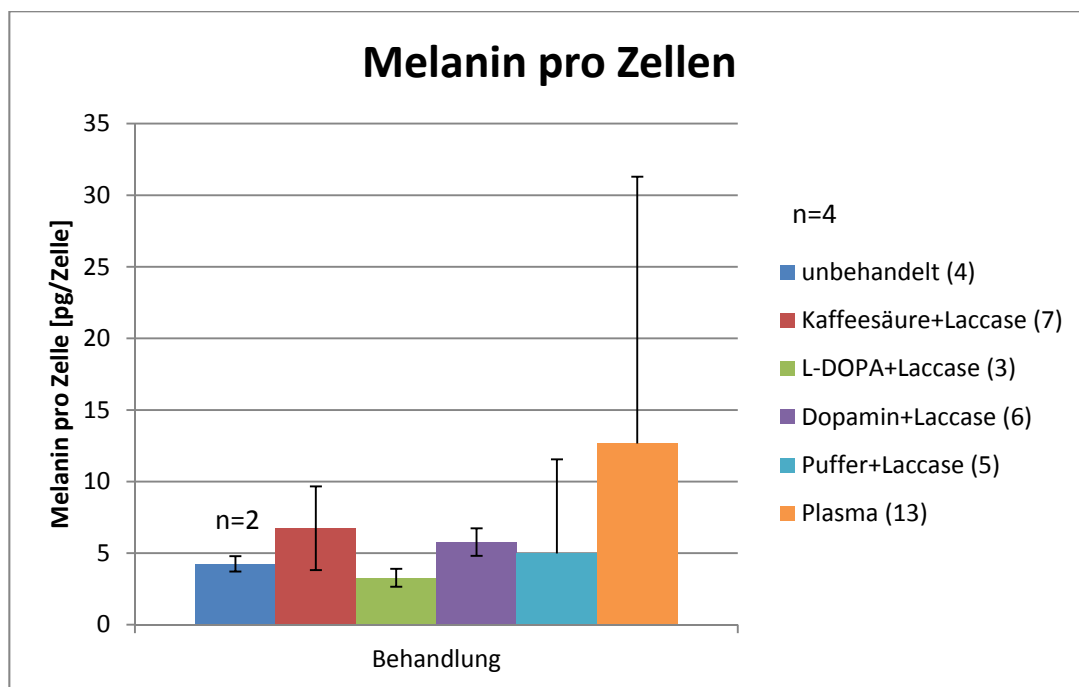


Abbildung 27 Berechnete Menge Melanin pro Zelle von HMs in PS-6-Lochplatte

5.6.3 Melaninproduktion von NHEMs auf PS-Scaffolds

Die im Diagramm (Abbildung 28, S.51) abgebildeten Werte sind zum größten Teil nicht aussagekräftig. Puffer und Laccase erreicht die höchste Anzahl an Zellen, danach folgen die Unbehandelte Oberfläche sowie Dopamin mit Laccase. Die hohen Stabw von Puffer mit Laccase und Dopamin mit Laccase führen allerdings dazu, dass sich die drei größten Werte in ihren Ergebnissen überlappen und keine klare Schlussfolgerung zulassen. Nur der kleinste Wert von Kaffeesäure mit Laccase, der 15-mal kleiner ist als der höchste Wert des Diagrammes ist zu allen anderen Werten signifikant.

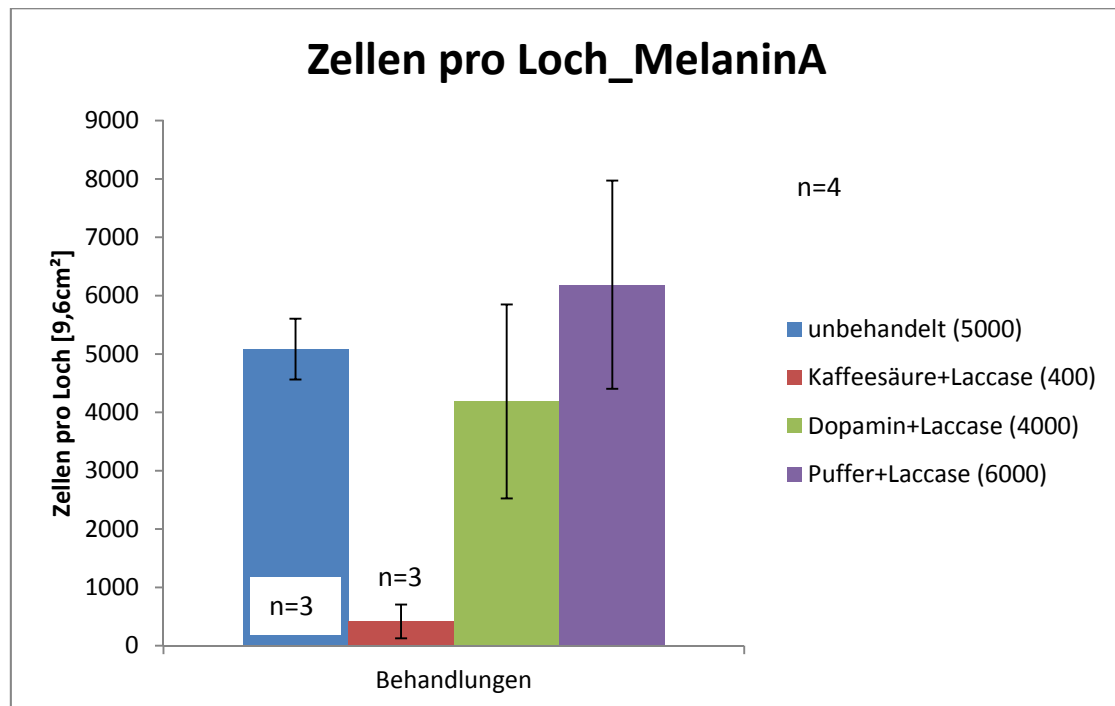


Abbildung 28 MW und Stabw der Anzahl an gezählten NHEMs in einem 12-Loch-PS-Scaffold von Versuch MelaninA

Kaffeesäure mit Laccase besitzt in dieser Abbildung (Abbildung 29, S.52) den höchsten Wert. Durch seine starke Stabw, ist diese Zellanzahl sehr ungenau. Die Abweichung überlappt sich zudem mit dem nächst kleinerem Wert von Dopamin mit Laccase. Die unbehandelte Oberfläche ist erreicht in diesem Versuch das kleinste Ergebnis. Dieses ist zwar klar von den beiden höchsten Werten abtrennbar, jedoch nicht vom nächst größeren Ergebnis von Puffer und Laccase. Dieser wiederum kann klar von Kaffeesäure mit Laccase und Dopamin mit Laccase unterschieden werden.

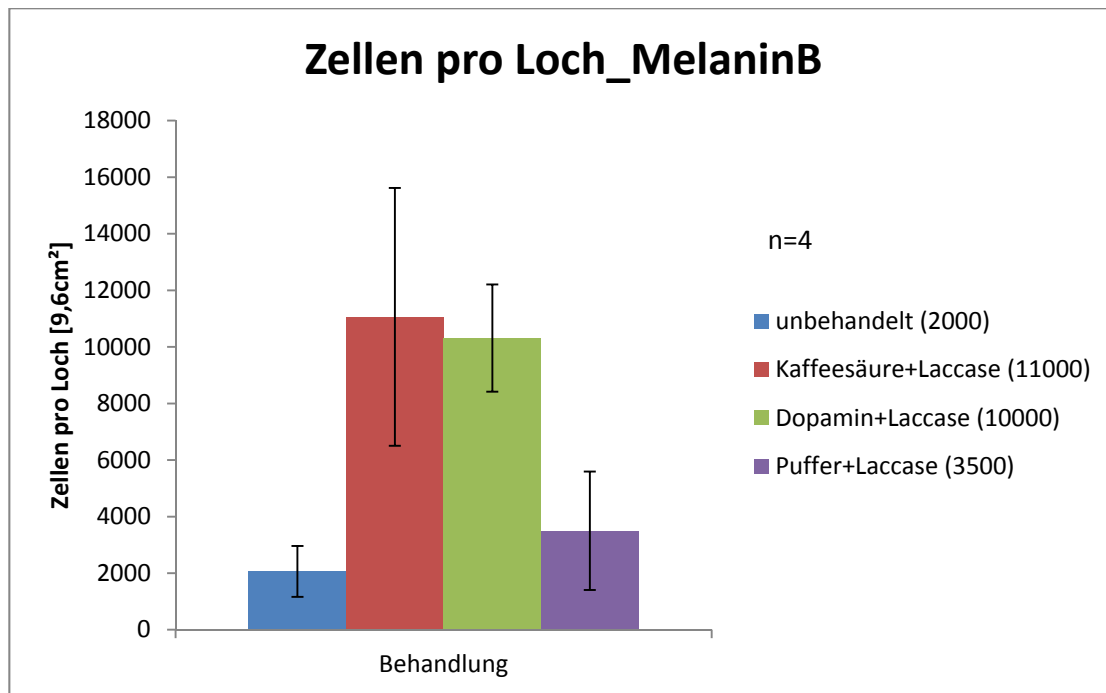


Abbildung 29 MW und Stabw der Anzahl an gezählten NHEMs in 12-Loch-PS-Scaffold von Versuch MelaninB

Das Bestimmtheitsmaß R^2 der Geraden, deutet auf eine zuverlässige Regression hin.

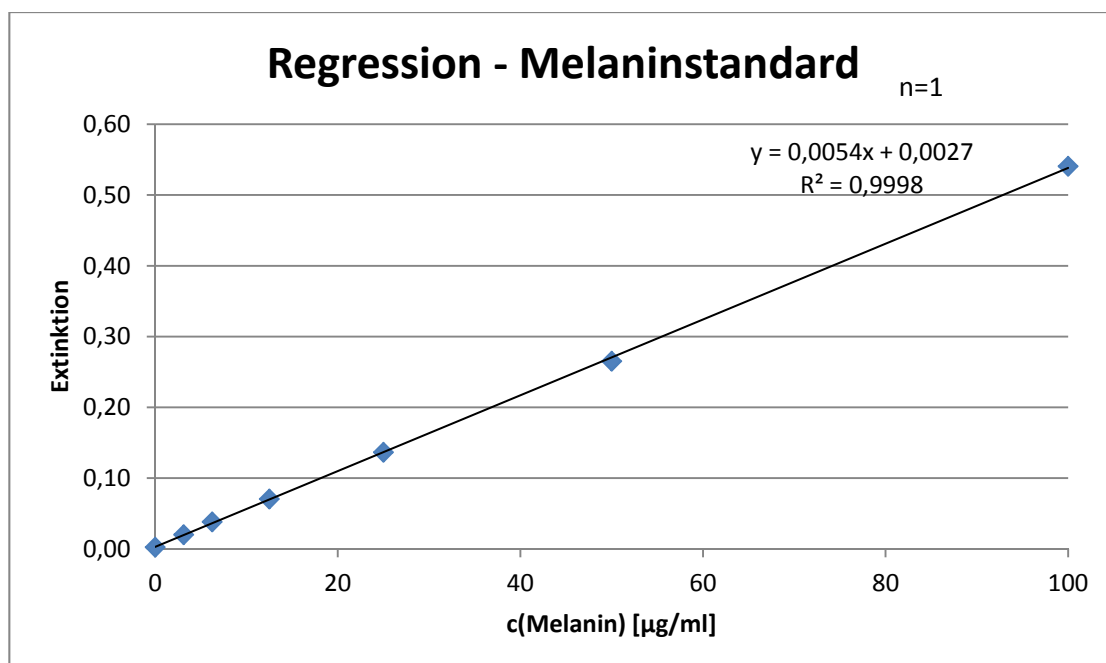


Abbildung 30 Standardkurve aus der Verdünnungsreihe des synthetischen Melanins für den Versuch NHEMs in 12-Loch-PS-Scaffold

Die Variante der unbehandelten Oberfläche besitzt hier den größten Wert (Abbildung 31, S.53). Die Stabw überlappt sich allerdings mit dem zweitgrößten Wert, Dopamin mit Laccase. Eine Festlegung auf eine bessere Modifizierung ist somit an dieser Stelle nicht möglich. Zwischen den Werte von unbehandelt und Puffer mit Laccase kommt es zu keinen Überschneidungen. Dafür liegt die Abweichung von Dopamin mit Laccase und Puffer mit Laccase sehr nah beieinander. So scheint es keine genaue Trennung zwischen ihnen zu geben. Auch der Wert vom kleinsten Ergebnis Kaffeesäure mit Laccase zeigt eine Auffälligkeit. Zwar lässt er sich klar von den Anderen abgrenzen, jedoch reicht durch die kleine Extinktion seine Stabw bis auf 0. Im Rahmen der Messfehler könnte geschlussfolgert werden, dass hier kein Melanin von den Zellen produziert wurde.

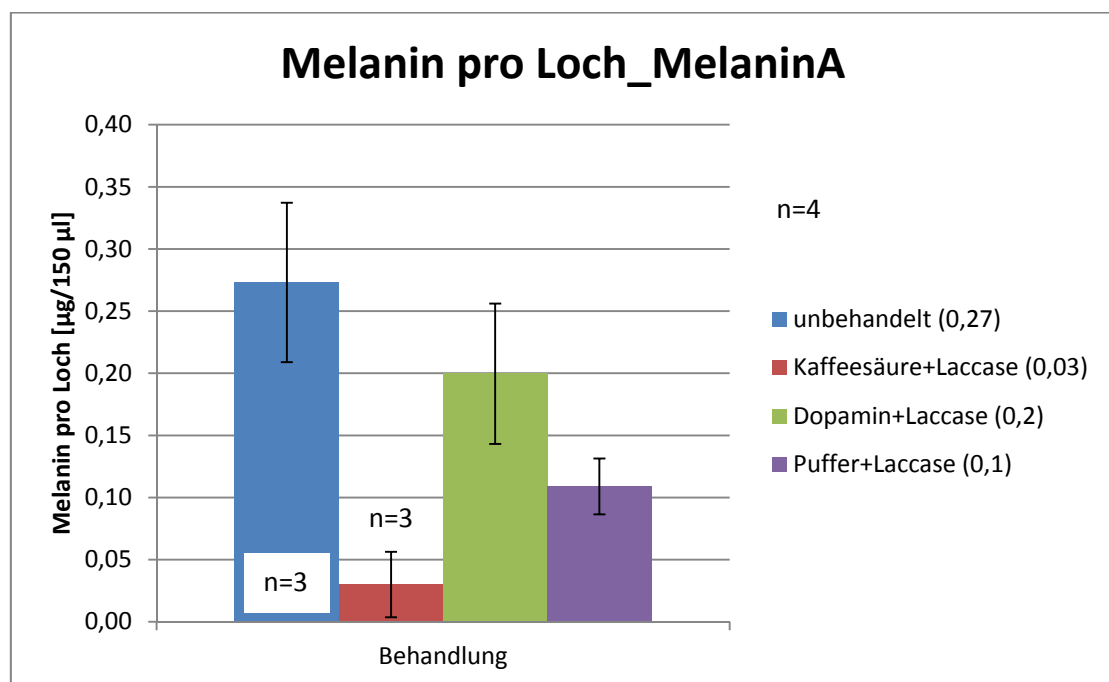


Abbildung 31 Berechnete Menge Melanin in 150 µl Lysat von NHEMs in 12-Loch-PS-Scaffold für Versuch MelaninA

Kaffeesäure mit Laccase erreicht in dieser Darstellung (Abbildung 32, S.5452) den höchsten Extinktionswert. Allerdings sind die Messwerte sehr inhomogen und somit von den restlichen Werten nicht abgrenzbar. Die Resultate von Dopamin mit Laccase und Puffer mit Laccase liegen dicht beieinander. Der kleinste Wert wird auf der unbehandelten Oberfläche erreicht. Die Varianz der Messwerte ist zu hoch um eine verlässliche Schlussfolgerung aus den Ergebnissen zu ziehen, auch wenn tendenziell höhere Werte auf den behandelten Oberflächen gefunden werden.

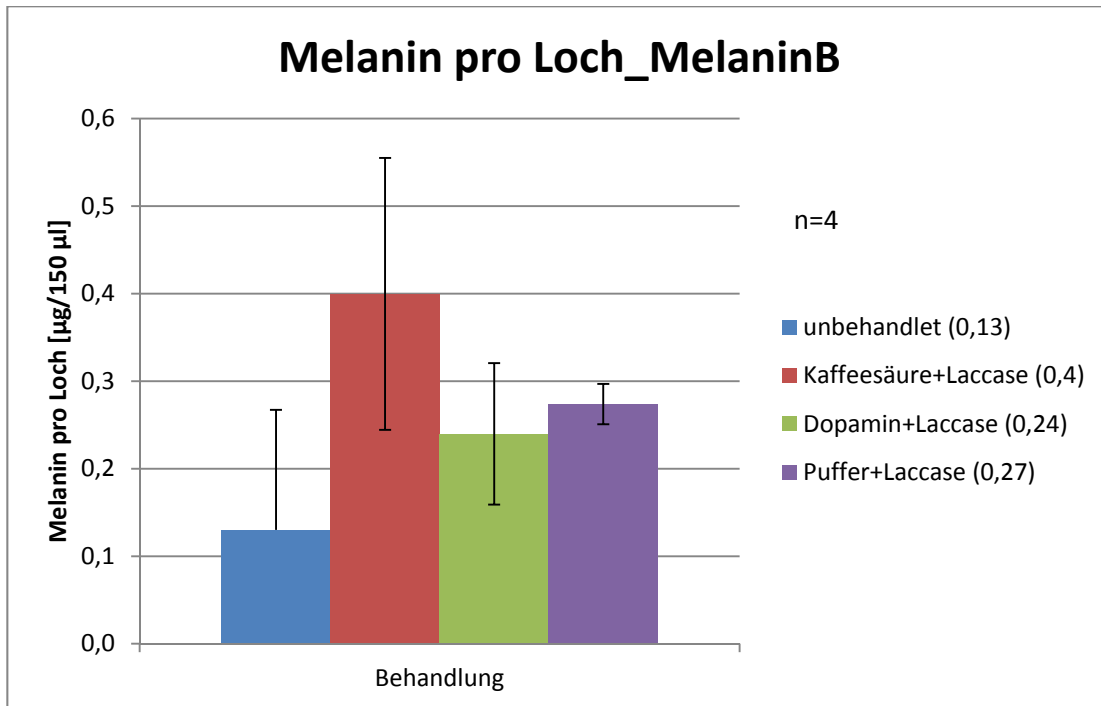


Abbildung 32 Berechnete Menge Melanin in 150 µl Lysat von NHEMs in 12-Loch-PS-Scaffold für Versuch MelaninB

In diesem Experiment (Abbildung 33, S.55) erreichte die unbehandelt Variante den höchsten Wert. Er liegt sehr dicht bei dem Wert für Dopamin mit Laccase. Auch die Stabw der beiden Behandlungsmethoden nehmen ein ähnliches Ausmaß an und überschneiden sich deshalb. Es kann nicht mehr festgestellt werden, welche der Modifikationen den größten Vorteil bringt. Beide Ergebnisse grenzen sich deutlich von Puffer mit Laccase ab. Dieser Wert liegt nur bei der Hälfte der beiden größeren. Der Balken von Kaffeesäure mit Laccase wurde im Diagramm nicht aufgeführt da auch nach Einberechnung der Zellzahl die voneinander stark abweichenden Messwerte eine Auswertung nicht erlauben.

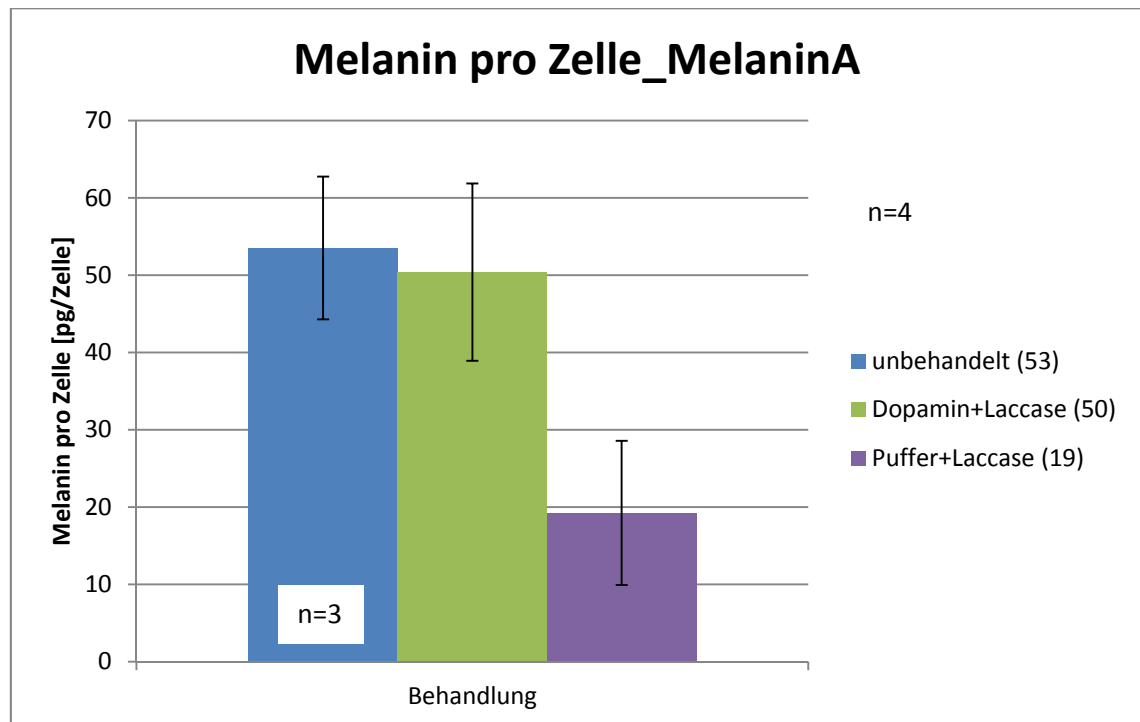


Abbildung 33 Berechnete Menge Melanin pro Zelle von NHEMs in 12-Loch-PS-Scaffold für Versuch MelaninA

In der Abbildung (Abbildung 34, S.56) besitzt die Behandlung Puffer mit Laccase den höchsten Wert. Die große Streuung der Messwerte führt aber dazu, dass diese nicht deutlich von Kaffeesäure mit Laccase und unbehandelt unterschieden werden kann. Es damit nicht möglich über einen Nach- oder Vorteil zwischen diesen zu entscheiden. Die einzige Aussage die aus dieser Abbildung getroffen werden kann ist, dass ein erkennbarer Unterschied zwischen Puffer mit Laccase und dem kleinsten Wert, Puffer mit Laccase, besteht.

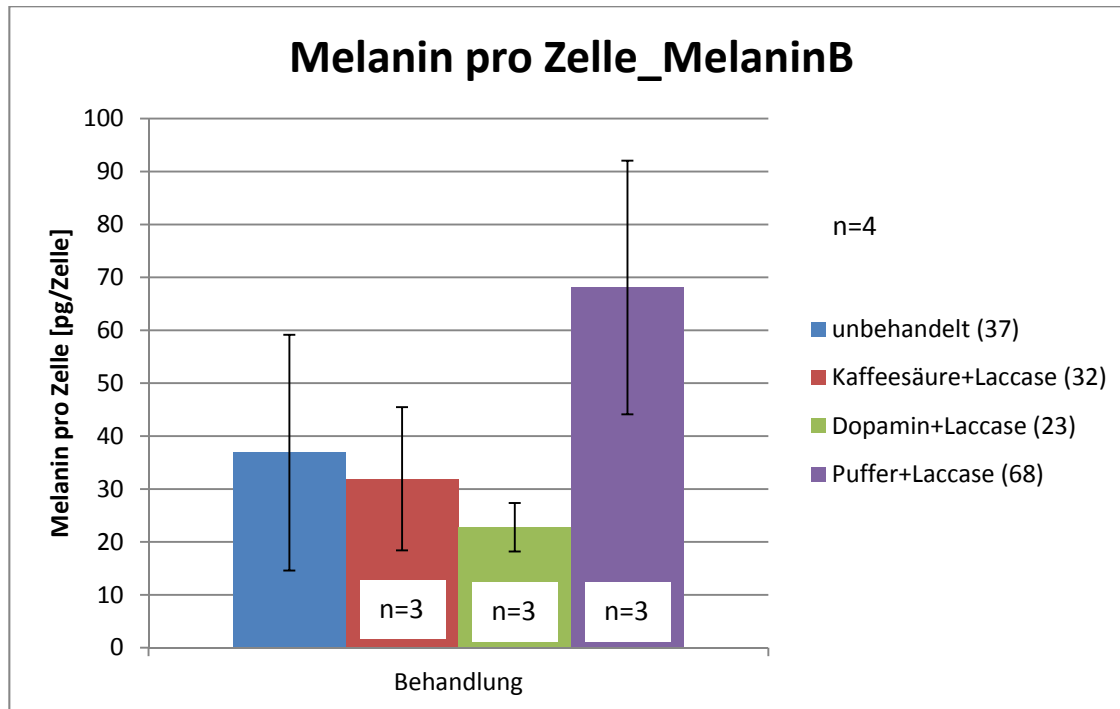


Abbildung 34 Berechnete Menge Melanin pro Zelle von NHEMs in 12-Loch-PS-Scaffold für Versuch MelaninB

6 Diskussion

6.1 Wachstum von MSCs auf PS

Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung mit Substraten und Laccase einen deutlichen Vorteil gegenüber einer unbehandelten Fläche bringt. Auch die Anwendung ohne Substrat bringt eine Verbesserung des Wachstums, jedoch in geringerem Maß wie mit Substrat.

Gut auf den Ausschnitten nach 2 Tagen zu erkennen sind die Unterschiede zwischen einer behandelten PP-Oberflächen und dem nativen PP. Nicht nur das sich auf den modifizierten Flächen mehr Zellen niedergelassen haben, die Morphologie der Zellen lässt auch darauf schließen das die MSCs an diesen Stellen vitaler sind. Der Vergleich der verwendeten Substrate mit der Laccase ist kein großer Unterschied zu erkennen. Der Ausschnitt der nur mit Laccase behandelt wurde scheint weniger stark mit Zellen bewachsen, die sich aber in ihrer Gestalt nicht von den Substrat-behandelten Flächen unterscheidet. Die reine Verwendung von Laccase erzielt bessere Resultate als die native PP-Oberfläche. Die Bilder, die nach 3 Tagen aufgenommen wurden, zeigen eine deutliche Veränderung im Vergleich zum Vortag. Auf allen Ausschnitten ist ein Wachstum der Zellen zu verzeichnen. Der Substrat-modifizierte Untergrund ist fast vollständig mit Zellen bedeckt. Auf der mit Laccase behandelten Oberfläche haben die MSCs ca. die Hälfte des Ausschnittes überwachsen. Auch die Zellen auf dem unbehandelten Platten haben begonnen sich zu vermehren, auch zeigen sie eine Verbesserung ihrer Morphologie. An den Stellen, an denen nach dem Aussäen mehr Zellen adhärirten, ist natürlich eine stärkere Überwachung mit Zellen zu erkennen. Es ist allerdings festzustellen, dass die verwendeten MSCs eine allgemein starke Vermehrungsrate zeigen. Vor allem das Verhalten der MSCs auf dem unbehandelten PS ist hervorzuheben. Die MSCs scheinen sich sehr gut an die ungünstigeren Oberflächen anzupassen. Gerade im Vergleich mit NHEMs, welche auch nach mehreren Tagen unter diesen Umständen eine schlechtere Morphologie und Proliferation aufweisen.

6.2 Wachstum von NHEMs auf PP und PS

Die Verwendung von Laccase mit Substraten führt zu einer erkennbaren Verbesserung des Wachstums von NHEMs auf den behandelten Oberflächen. Besonders zuverlässig sind die Substrate L-DOPA und Dopamin in Verbindung mit Laccase.

Die Auswertung der Bilder lässt verdeutlichen, dass sich die kombinierte Behandlung mit Substrat und Laccase positiv auf die Adhäsion der Zellen auf einer PP-Oberfläche auswirkt. Vor allem unterstützend wirken L-DOPA und Dopamin, auf deren Flächen die Zellen gleichmäßig verteilt sind. Der Vergleich von unbehandelter Fläche und mit Laccase behandelter Fläche lässt keine ersichtlichen Unterschiede erkennen. Die Resultate der Quantifizierung unterstützen diese Aussage über den positiven Effekt der Laccasebehandlung in Verbindung mit Substraten. Der Wert für Kaffeesäure und Laccase zeigt eine höher Dichte der Zellen im gemessenen Bereich verglichen zum unbehandeltem PP. Allerdings verliert diese Aussage bei Betrachtung der enormen Standardabweichung, die fast so groß wie der Mittelwert selbst ist, wieder an Kraft. Auch bei L-DOPA und Dopamin sind die Standardabweichungen ähnlich des Wertes von Kaffeesäure, jedoch sind die Mittelwerte doppelt so groß. Dadurch entsteht ein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Oberfläche. Somit lässt sich schlussfolgern, dass diese Art der Modifikation einen reproduzierbar, positiven Vorteil bringt. Die Behandlung nur mit Laccase wirkt sich bei PP als Material nicht aus. Die Mittelwerte und Standardabweichungen liegen auf einem ähnlichen Niveau.

Der Vergleich der zwischen den unterschiedlichen Kunststoffen auf denen die NHEMs gewachsen sind zeigt ähnliche Beobachtungen bezogen auf die Art der Behandlungen. Werte der unbehandelten Oberflächen zeigen dasselbe Ergebnis. Es sind an diesen Stellen der Polymere nur wenige NHEMs adhärirt und die Werte schwanken stark. Ein Unterschied lässt sich bei Kaffeesäure mit Laccase feststellen. Die Zellen wachsen auf der PS-Oberfläche besser als auf behandelten PP. Auch ist festzustellen, dass die Standardabweichung im ersten Fall vorteilhafter ist. So scheint die Behandlung mit Kaffeesäure und Laccase auf PS einen stärkeren und auch stabileren Effekt auf die NHEMs zu haben. Bei L-DOPA mit Laccase und Dopamin mit Laccase ist festzustellen, dass sich diese beiden Modifikationen nicht voneinander unterscheiden. Sowohl die MW als auch die Stabw liegen auf einem sehr ähnlichen Niveau. Die Gegenüberstellung der unterschiedlichen Kunststoffe zeigt jedoch, dass die Behandlung auf Polystyrol stabilere Resultate erzeugt. Der Vergleich von Dopamin mit Laccase und Dopamin ohne Laccase zeigt einen Vorteil auf Seite der enzymatischen Reaktion. Zum einen erzeugt die Behandlung mit Laccase höhere Werte, zum anderen sind die Werte auch stabiler. Dies lässt sich durch die

Fähigkeit des Dopamins zur Eigenpolymerisation erklären. Dopamin oxidiert trotz dieser geringen Konzentration unter Luftsauerstoff von alleine. Diese Reaktion benötigt allerdings mehr Zeit. Auf der Oberfläche bilden sich verteilt Stellen die modifiziert sind und einige Stellen an denen noch keine Polymerisation stattgefunden hat. In der Behandlungsdauer hat die Laccase im Gegenteil dazu schon nach kurzer Zeit das Dopamin umgesetzt und die Oberfläche gleichmäßig verändert. Dadurch kommt es zu einer einheitlichen Ausbreitung der Zellen und so zu besseren und stabileren Ergebnissen. Die Gegenüberstellung der Resultate der Behandlungen mit Puffer und Laccase zeigt, dass auf PP keine Verbesserung zu beobachten ist. Der Wert liegt zuverlässig auf einem Niveau mit dem unbehandelten PP. Hingegen scheint die Modifikation mit Puffer und Laccase das Wachstum auf der Oberfläche zu begünstigen. Allerdings ist auch hier eine ungleichmäßige Verteilung der Zellen zu erkennen, da die Stabw sehr groß ist

6.3 WST-Analyse

6.3.1 WST-Analyse von Zellen auf Oberflächen

Die enzymatische Behandlung von PS-Oberflächen verbessert deutlich die Aktivität der Zellen. Besonders in Verbindung mit verschiedenen Substraten zeigen diese Modifikationen, dass sie mit einer plasmabehandelten Oberfläche vergleichbar sind.

Der Vergleich der WST-Ergebnisse von NHEMs und HMs zeigt einen Unterschied in der Wirkung der einzelnen Behandlungen auf die Zellen. Die Auswertung der Extinktionsdaten der NHEMs zeigt eine Erhöhung der Werte vor allem bei den Zellen die auf Oberflächen wuchsen die mit Substrat und Laccase oder Plasma behandelt wurden. Ebenfalls ist ein erhöhter Wert bei den Zellen, die auf der Oberfläche mit Puffer und Laccase wuchsen, zu erkennen. Durch diese Ergebnisse ist auf eine allgemein auf verstärkte mitochondrielle Aktivitäten, im Vergleich zu NHEMs die auf einer unbehandelten Oberfläche wuchsen, festzustellen. Zwar zeigt sich ein ähnliches Bild bei den HMs, jedoch sind die Abgrenzungen zwischen den einzelnen Behandlungen nicht so deutlich. Zudem lässt sich sagen, dass die Extinktionswerte gesamt bei den HMs geringer sind. Das bedeutet, dass die Zellen weniger WST umsetzen konnten und die HMs somit eine geringere mitochondrielle Aktivität besitzen. Grundsätzlich lässt sich jedoch sagen, dass die WST-Analyse eine erhöhte Aktivität der Zellen auf den mit Substrat und Laccase behandelten Oberflächen zeigt. Sowohl für NHEMs als auch für die HMs.

6.3.2 WST-Analyse mit NHEMs auf Scaffolds

Werden die Resultate der WST-Analyse auf Oberflächen als Grundlage für die Untersuchung der Aktivität auf Scaffolds genommen, so ist ebenfalls von einer Verbesserung der Werte auf den Laccase-behandelten Matrizen auszugehen.

Der Vergleich der Diagramme zeigt große Unterschiede innerhalb eine Behandlungsvariante und auch bei den Verhältnissen der Werte eines Diagrammes. So zeigt die Gegenüberstellung des kleinsten Wertes aus Versuch A, dass selbst mit Berücksichtigung der Standardabweichung dieser noch größer ist, als der größte Wert mit Standardabweichung bei Diagramm B. Da bei diesen Versuchen dieselbe Passage der Zellen verwendet wurde, sollte davon ausgegangen werden können, dass sich die Extinktionsergebnisse der auf einem ähnlichen Niveau einfinden. Da jedoch die Zellen unterschiedliche Bedingungen während ihrer Kultivierung erfahren haben können, wäre dieses Resultat noch vertretbar. Aber selbst unter diesen Voraussetzungen wäre zu erwarten, dass die Verhältnisse zwischen den einzelnen Behandlungen, nicht zu sehr voneinander abweichen. So lässt sich bei Abbildung A keine Aussage über die Vorteile von Modifikationen treffen, wohingegen bei Abbildung B ein eindeutiger Vorteil bei Puffer mit Laccase und unbehandelten Scaffolds liegt. Festzustellen ist, dass die Behandlungen bei denen ein Substrat anwesend war, bei allen Versuchen dicht bei einander liegen und dass durch die entsprechenden Standardabweichungen keine Unterscheidungen zwischen den beiden zulassen. In den Fällen in denen eine eindeutige Aussage getroffen werden kann, liegen die Werte von Puffer mit Laccase und der unbehandelten Fläche immer vor den Modifikationen mit Kaffeesäure und Dopamin.

Die Auswertung der Abbildungen zur Anzahl der Zellen pro Scaffold ist nur bei Versuch A möglich. Bei der Berechnung der anderen beiden Versuche fielen die Extinktionen von Kaffeesäure mit Laccase und Dopamin mit Laccase unter den Bereich der von den Standardkurven dargestellt war. Die dadurch entstanden Werte sind nicht verwendbar. Der Vergleich der Extinktionswerte und der Zellanzahl von Versuch A zeigt ein ähnliches Bild, allerdings haben sich die Verhältnisse der Werte untereinander verändert. Vor allem Puffer mit Laccase ist jetzt doppelt bzw. 3-mal so groß wie die restlichen Varianten. Dies liegt aber wahrscheinlich an dem etwas anderem Verlauf der Regressionsgeraden. Die Diagramme B und C der Zellanzahl spiegeln ihre Extinktionswerte annähernd wieder. Auffällig im Diagramm von Versuch C ist, dass die Anzahl der Zellen noch kleiner ist als die Menge die auf das Scaffold zu Beginn ausgesät wurde. Das würde jedoch bedeuten, dass bei diesem Versuch in den unbehandelten Scaffolds die Mortalität der Zellen größer war als ihre Proliferation.

Die Annahme von übertragbaren Ergebnissen von Oberflächen auf Scaffolds konnte nicht bestätigt werden. Trotz gleicher Bedingungen und eine zusätzliche Auswertung mit Standardkurven der einzelnen Behandlungen sind die erhaltenen Resultate weder aussagekräftig noch scheinen sie reproduzierbar. Ein Grund für diese überraschenden Ergebnisse könnte ein Problem sein, das während der Kultivierung der Zellen aufgetreten ist. Problematisch ist, dass aufgrund der Struktur des PS eine Kontrolle der Zellen unter dem Inversmikroskop mit normalem Durchlicht nicht möglich ist. Die Zellen können nur durch eine Fixierung mit anschließender Färbung sichtbar gemacht werden. Dies stellt jedoch nur eine Momentaufnahme des aktuellen Zustandes der Zellen dar. Auch die Kontrolle in der PS-Platte ist in diesem Fall nicht hilfreich.

6.4 Bestimmung der Melaninproduktion

6.4.1 Bestimmung der Melaninproduktion auf Oberflächen

Da es sich bei den verwendeten Zellen unter anderem um nicht vollkommen ausdifferenzierte Melanozyten handelt, ist ein Unterschied in der Melaninproduktion zu erwarten.

Beim Vergleich der beiden Zelllinien auf behandelten Oberflächen lassen sich vor allem bei der Anzahl der Zellen ähnliche Ergebnisse erkennen. Zwar wurden beim Versuch mit HMs weniger Zellen gezählt, allerdings scheinen die unterschiedlichen Modifikationen auf die verschiedenen Zelllinien dieselben positiven Effekte zu haben. Besonders auffällig bei den HMs ist, dass die bestimmten Anzahlen der Zellen durchgängig unter der Anzahl der ausgesäten Zellen liegen. Zudem sind die Schwankungen der Werte hier höher. Das könnte daran liegen, dass die HMs noch nicht vollständig ausdifferenziert sind und daher empfindlicher auf Oberfläche reagieren. Die Gegenüberstellung der Melaninmengen pro Loch, zeigt dagegen Unterschiede in der Syntheseaktivität der Zellen. Bei den NHEMs wird dort mehr Melanin produziert, wo sich auch mehr Zellen befinden. Bei den HMs hingegen bedeuten mehr Zellen nicht zwangsläufig eine höhere Ausbeute. Auch bei der Melaninmenge pro Zelle sind deutliche Unterschiede erkennbar. So zeigt sich bei den NHEMs, dass die Behandlungen mit Substrat und Laccase zu einer Verbesserung der Synthese pro Zelle bewirkt. Leider ist kann durch die große Standardabweichung bei den Zellen der unbehandelten Oberfläche und Puffer mit Laccase kein Vergleich mit diesen Werten gezogen werden. Bei den HMs liegen die Werte auf einem sehr ähnlichen Niveau. Hier kann also keine Schlussfolgerung auf den endgültigen Effekt einer Behandlung geschlossen werden. Die hohen Standardabweichungen der Werte der Zellen von Puffer mit Laccase und Plasma lassen hier ebenfalls keinen Vergleich zu. Auch für die durchgehend

ähnlichen Konzentrationen pro Zelle der HMs kann die unvollständige Differenzierung verantwortlich gemacht werden. Bei diesen Experimenten spielen sehr viele verschiedene Faktoren eine Rolle, so dass die beiden aus den vorangegangenen Ergebnissen deutlich gewordenen Unterschiede hier zu sehr starken Abweichungen führen. Die Melaninproduktion kann sowohl von der Zellzahl, der Wachstumsdauer, der Fitness der Zellen und der Zelldichte abhängen. Bei gleichzeitiger Variation aller Parameter muss es zu Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse kommen.

Allgemein kann bei zweidimensionalen Kulturen gesagt werden, dass bei den NHEMs eine klare Verbesserung der Melaninproduktion der Zellen, durch eine Behandlung mit Substraten und Laccase, erreicht werden kann. Der Test bei den unvollständig differenzierten HMs scheint dagegen noch nicht ausgereift und könnte in weiteren Experimenten untersucht werden.

6.4.2 Bestimmung der Melaninproduktion auf Scaffolds

Die bereits erwähnten Schwierigkeiten bei der Melaninproduktion auf Oberflächen werden auch die Untersuchungen auf den Scaffolds erschweren. Besonders die bereits oben genannten Probleme in Bezug auf die Entwicklung der Zellen während der Kultivierung werden eine Auswertung der Daten noch weiter erschweren.

Der Vergleich der ausgezählten Zellen von beiden Versuchen zeigt große Unterschiede. Beispielsweise besitzt die unbehandelte Fläche im Versuch A den zweitgrößten Wert. Bei Experiment B jedoch steht diese Variante an letzter Stelle. In Experiment B besitzt Kaffeesäure mit Laccase den höchsten Wert an Zellen. Obwohl hier die Stabw sehr hoch ist, fällt das Ergebnis von Kaffeesäure mit Laccase im Versuch A noch weit darunter. Dieselben Resultate werden bei der Gegenüberstellung der anderen Behandlungen erreicht. Werden nun die Ergebnisse der Melaninproduktion auf PS-Oberflächen als Vergleich dazu gezogen, kann festgestellt werden, dass hier trotz unterschiedlicher Zelltypen und Passagen der Zellen, dennoch ähnliche Verhältnisse zwischen den einzelnen Behandlungsmethoden zu erkennen sind. So sind hier die höheren Zellzahlen bei den Substraten in Verbindung mit Laccase zu finden. Zum Beispiel hat L-DOPA mit Laccase in beiden Fällen den höchsten Wert. Auch steht die Plasmabehandlung bei beiden Versuchen an zweiter Stelle. Die unbehandelte Fläche hat sowohl bei den NHEMs als auch bei den HMs die kleinste Zellzahl. Bei der Anzahl der Zellen des Scaffoldversuches ist außerdem hervorzuheben, dass diese immer konsequent weit unter den 100000 Zellen pro Scaffold liegt, die zu Beginn der Versuche ausgesät wurden. Das Problem der unterschiedlichen

und zu wenigen Zellen liegt mit großer Wahrscheinlichkeit am Versuch die Zellen aus den Scaffolds zu lösen. Trotz einer Inkubationszeit des Trypsins von 15 min bei 37 °C, die auch von der Herstellerfirma der Scaffolds empfohlen wurde, und zusätzlichen Abklopfen der Platten mit den Scaffolds, war der Effekt nur gering. Obwohl die Matrizen mehrmals mit PBS nachgespült wurden, konnte kein zufriedenstellender Effekt erreicht werden. Es stellt sich die Frage, in welcher Weise das gesamte Zellmaterial aus dem System entfernt werden kann. Weiter Ansätze wären mit Hilfe von Ultraschall oder durch die Zerkleinerung der gesamten Matrice und die anschließende Lyse der Zellen mit Scaffold. Das Problem dieser Methoden besteht allerdings darin, dass eine quantitative Bestimmung der Zellen, wegen ihrer Zerstörung, nicht mehr möglich ist. Auch bei der Auswertung der Melaninmengen bezogen auf das gesamte Scaffold zeigen sich große Abweichungen zwischen den Experimenten. Die Zellen der unbehandelten Matrizen haben im Versuch A die höchste Menge an Melanin produziert, im Versuch besitzen sie den kleinsten Wert. Genau umgekehrt verhält es sich bei Kaffeesäure mit Laccase. Im Versuch A wird hier die kleinste Menge an Melanin synthetisiert, bei Versuch B erreichen sie den größten Wert. Zudem muss, wie bereits im Ergebnisteil erwähnt, davon auszugehen, dass die Werte von Kaffeesäure mit Laccase (VersuchA) und unbehandelt (VersuchB) durch ihre Stabw auf null fallen und eine Produktion von Melanin ausgeblieben ist. Durch die Betrachtung des Melaningehaltes pro Zelle besteht die Möglichkeit zu zeigen, dass die Zellen nicht nur mehr Melanin produziert haben, weil es mehr in der Kultur waren sondern auch das die Zellen mehr produziert haben, weil sie bessere Bedingungen vorfinden. Auch bei dieser Betrachtung zeigen sich große Differenzen zwischen den Versuchen. Vor allem hervorzuheben sind die unterschiedlichen Mengen Melanin pro Zelle zwischen den Versuchen, trotz derselben Behandlung. Beispielsweise produziert eine Zelle bei Dopamin mit Laccase im Versuch A die doppelte Menge an Melanin als im Versuch B. Hingegen entsteht in einer Zelle bei Puffer mit Laccase nur ein-drittel der Menge Melanin als bei derselben Behandlung im Experiment B. Es ist festzustellen, dass die Zellen aus den Scaffolds im Schnitt mehr Melanin produzieren, als die Zellen von den zweidimensionalen Oberflächen.

Allgemein lässt sich über den Bestimmung des Melaningehaltes in dreidimensionalen Strukturen sagen, dass sich unter dieser Versuchsdurchführung keine wirklich aussagekräftigen Ergebnisse erzeugen lassen. Wie bereits im Vorfeld erwähnt, sollte über weitere Möglichkeiten zur Gewinnung des Zellmaterials aus den Scaffolds nachgedacht werden. Zellzerstörende Methoden wie bereits vorgeschlagen würden jedoch eine Berechnung der des Melaningehaltes pro Zelle verhindern. Die Verwendung einer WST-Analyse mit Standardkurve könnte eine Variante sein um auf die Anzahl der Zellen zurückzuschließen.

6.5 Immunfluoreszenz

Die Bilder der Immunfluoreszenz von NHEMs auf den PS-Scaffolds zeigen den Vorteil von dreidimensionalen Strukturen. Struktur des Materials erlaubt den Zellen eine räumliche Ausdehnung. Diese erlaubt es den Zellen eine Morphologie auszubilden die ihrer natürlichen Form im Organismus mehr ähnelt.

7 Ausblick

Die gewonnenen Ergebnisse der Arbeit geben Raum für weiterführende Untersuchungen. Zum können die in der Arbeit verwendeten Methoden weiter ausgebaut und verbessert werden. Eine Suche nach anderen Materialien und Oberflächen, die mit den Substraten und der Laccase behandelt werden können, wäre wünschenswert. Dabei wären standardisierte Produkte vorteilhaft. Neben den verwendeten Zelllinien der Haut, könnten weitere Arten von Zellen untersucht werden. Vor allem die weitere Untersuchung der MSCs scheint gerade im Bereich der regenerativen Medizin sehr interessant. Im Bereich der Hautzellen könnte nach Erprobung neuer Scaffolds mit Cokulturen gearbeitet werden um eine Nachbildung von Hautschichten zu testen.

8 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass es durchaus Möglichkeiten außer der konventionellen Plasmabehandlung gibt, hydrophobe Flächen so zu behandeln, dass sie eine freundlichere Umgebung für Zellen bieten. Durch eine enzymatische Behandlung würden die bereits oben genannten negativen Effekte der Plasmabehandlung ausbleiben. Die verwendeten Methoden die zur Untersuchung der Zellen verwendet wurden, sind auf zweidimensionalen Oberflächen sehr wirksam und verlässlich. Jedoch die Anwendung auf dreidimensionale Strukturen, wie die verwendeten PS-Scaffolds, scheint noch nicht genügend untersucht. Allgemein lässt sich sagen, dass eine positive Wirkung von Laccase mit Substraten auf das Wachstum der Zellen gezeigt werden konnte, die auf einer Stufe steht mit der Behandlung von Oberflächen von Plasma. Die Behandlung von Scaffold besitzt ein großes Potential, sie kann dort ansetzen wo eine Plasmabehandlung von bestimmten Materialien nicht möglich ist.

9 Literatur

- Abbott, A. (2003) Abbott, A. (2003) Cell culture: biology's new dimension. *Nature* 424, 870–872
- Ayala P, Lopez J, Desai T. (2010) Ayala P, Lopez J, Desai T. (2010) Microtopographical cues in 3D attenuate fibrotic phenotype and extracellular matrix deposition: implications for tissue regeneration. *Tissue Eng Part A*.16:2519-27
- Bissell, M.J. et al. (2003) Bissell, M.J. et al. (2003) Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 753–762
- Bonaventure J, Kadhon N, Cohen-Solal L, Ng K, Bourguignon J, Lasselin C, *et al.* (1994) Bonaventure J, Kadhon N, Cohen-Solal L, Ng K, Bourguignon J, Lasselin C, *et al.* (1994) Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res.*;212: 97-104
- Brenner, M. & Berking, C. (2010) Brenner, M. & Berking, C. (2010) Grundlagen der Hautpigmentierung. *Der Hautarzt*. Vol. 61: 554-560
- Cui, J., L.Y., Shen & G.C., Wang (1991) Cui, J., L.Y., Shen & G.C., Wang (1991) Role of hair-follicles in the repigmentation of vitiligo. *Journal of Investigative Dermatology*. Vol. 97: 410-416

- [Gangji et al. 2004] Gangji V, Hauzeur JP, Matos C, De M, V, Tounouz M, Lambermont M (2004) Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. A pilot study. *J Bone Joint Surg Am* 86-A:1153-1160
- Gopferich, A. (1996) Gopferich, A. (1996) Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 17, 103–114
- Hua, N. & Sun, J. (2008) Hua, N. & Sun, J. (2008) Body distribution of poly(D,L-lac-tide-co-glycolide) copolymer degradation products in rats. *J. Mater. Sci-Mater. M.* 19, 3243–3248
- Inakagi N., Narushima K. & Lim S K. (2003) Inakagi N., Narushima K. & Lim S K. (2003) Effects of aromatic groups in polymer chains on plasma surface modification. *J. Appl. Polym. Sci.* 89: 96-103
- Jiao Y.-P. & Cui F.-Z (2007) Jiao Y.-P. & Cui F.-Z (2007) Surface modification of polyester biomaterials for tissue engineering. *Biomed. Mater* 2, R24-R37
- Jing, D. Y., Zhang, J. C., Wu, L. B. & Ding, J. D. (2005) Jing, D. Y., Zhang, J. C., Wu, L. B. & Ding, J. D. (2005) Degradation study of poly(lactic acid) porous scaffold at different temperatures. *Polym. Mat. Sci. Eng.* 21, 162–164
- Haycock J. W. et al. (2010) Haycock J. W. et al. (2010) 3D Cell Culture: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology* Vol. 695:323-340
- Kunamneni, A., J. Plou, F., Ballesteros, A. & Alcaid, M. (2008) Kunamneni, A., J. Plou, F., Ballesteros, A. & Alcaid, M. (2008) Laccases and their applications: A patent review. *Recent Patents on Biotechnology*. Vol. 2: 10-24

- Li C, Tian T, Nan K, Zhao N, Guo Y, Cui J, *et al* (2008). Survival advantages of multicellular spheroids vs. monolayers of HepG2 cells in vitro. *Oncol Rep.*20:1465-71
- Müller-Klieser W. (1997) Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *American Journal of Physiology* Vol. 273: C1109-C1123
- Ostergrad D. R. & Patel H. (2012) Post-Implantation Alterations of Polypropylen in Human. *The Journal of Urology* Vol. 188: 27-32
- Running, M.P. et al. (1995) Confocale Mikroskopie der Sproßspitze. *Methods Cell Biol.* 49: 217-229
- Ryan J. A. (2008) Evolution of Cell Culture Surfaces. *BioFiles*: 21
- Sato H. & Ogawa H. (2009) Review on Development of Polypropylene Manufacturing Process. *Sumitomo Kagaku* 2: 11-11
- Schiaffino, Maria Vittoria (2010) Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. Vol. 42: 1094-1104
- Schmitz, Sabine (2011): *Der Experimentator: Zellkultur*. 3. Auflage: Spektrum Akademischer Verlag: 130-136
- Tobin, D.J. (2008) Human hair pigmentation – biological aspects. *International Journal of Cosmetic Science*. Vol. 30: 233-257

- Tobin, D.J. & J.C., Bystry (1996) Different populations of melanocytes are present in hair follicles and epidermis. *Pigment Cell Research*. Vol. 9: 304-310
- Tolk, Kai Michael (2009) Untersuchung der biologischen Rolle der Melanozyten in der humanen Talgdrüse. 55 Seiten Westfälische Wilhelms – Universität Münster, Medizinische Fakultät, Inaugural-Dissertation: 1-15
- Vespermann, Ute (2005) Verbesserte Zellanheftung und Oberflächenstabilität für Zellwachstum und zellbasierte Assays. *BioSpektrum*. Vol.11:461-462
- Warning, M (1975) Waring, M. (1975) Ethidium and Propidium in Antibiotics (J.W. Corcoran & F.E. Hahn eds.) Springer-Verlag. Vol. 3: 141-165;
- Wilhelm S., Gröbler B, Gluch M., Heinz H. (unbekannt) Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie. Karl Zeiss Jena GmbH: 1-24
- Wood, D.A., (1979) Wood, D.A., (1979) Production, Purification and Properties of Extracellular Laccase of *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* Vol. 117:327-338
- [Wulf et al. 2006] Wulf GG, Chapuy B, Trumper L (2006) Mesenchymal stem cells from bone marrow. Phenotype, aspects of biology, and clinical perspectives. *Med Klin(Munich)* 101:408-413
- V.J. Hearing (1999) V.J. Hearing (1999) Biochemical Control of Melanogenesis and Melanosomal Organization. *J Investig Dermatol.* Vol. 4: 24-28

- Yamaguchi, Y & V.J. Hearing (2009) Physiological factors that regulate skin pigmentation. BioFactors. Vol. 35: 193-199 (2009)
- [URL1] (9.18.13) Dhaliwal A.: Three Dimensional Cell Culture: A Review. URL: <http://www.labome.com/method/Three-Dimensional-Cell-Culture-A-Review.html>
- [URL2] (15.05.2013), Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag Lexikonredaktion URL: <http://www.tk.de/rochelexikon/ro07500/r07921.000.html>
- [URL3] (15.05.2013), Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag Lexikonredaktion URL: <http://www.tk.de/rochelexikon/ro07500/r07920.000.html>
- [URL4] (9.9.13) Sanz Nogués C. & Creane M.: Mesenchymale Stammzellen: die „anderen“ Knochenmark-Stammzellen. URL: <http://www.eurostemcell.org/de/factsheet/mesenchymale-stammzellen-die-%E2%80%9Eanderen-knochenmark-stammzellen>
- [URL5] (15.05.2013) Stintzing, F.C.: Kaffeesäure. URL: <http://www.roempp.com/prod/>
- Datasheet1 Datasheet1: abcam®. Anti-Melanoma Associated Antigen 100+ / 7 kDa antibody [NKI/beteb] ab34165
- Datasheet2 Datasheet2: Roche (2005) Cell Proliferation Reagent WST-1

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Riesa, 14.09.2013

A handwritten signature in black ink, reading "Martin Wilhelm". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke at the end.

Martin Wilhelm